

Aus der Klinik für Herz- und thorakale Gefäßchirurgie
Direktor: Prof. Dr. med. Ardawan J. Rastan
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

Die mRNA Expression der Isoformen 4.1 und 4.2 der Untereinheit 4 der Cytochrom-c-Oxidase bei Vorhofflimmern

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin
dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Pia Cybulski aus Berlin-Charlottenburg

Marburg, 2020

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am:
09.07.2020

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin.

Dekan: Prof. Dr. Helmut Schäfer

Referent: Prof. Dr. Sebastian Vogt

Korreferent: Prof. Dr. Heinz-Gert Höffkes

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	1
Abkürzungsverzeichnis	3
Abbildungsverzeichnis	6
Tabellenverzeichnis	10
1. Einleitung	11
1.1 Vorhofflimmern	11
1.1.1 Epidemiologie	11
1.1.2 Definition, Pathomechanismen	11
1.1.3 Folgeerkrankungen	14
1.1.4 Ätiologie	14
1.1.5 Therapie	15
1.1.6 Aktuelle Forschungsansätze	16
1.1.7 Ausblick, Möglichkeiten	17
1.2 Stoffwechsel der Herzmuskelzelle	17
1.2.1 Kalzium-Stoffwechsel	17
1.2.2 Proteinkinasen	19
1.2.3 Bioenergetischer Effekt	19
1.2.4 Oxidativer Stress	20
1.3 Atmung des Myokards	21
1.3.1 Mitochondrien, Atmungskette	21
1.3.2 Cytochrom-c-Oxidase	22
1.3.3 Untereinheit 4 der Cytochrom-c-Oxidase	23
1.3.4 Regulation der CytOx	23
1.3.5 CytOx 4-Isoformenswitch	24
1.4 Fragestellung	26
2. Materialien und Methoden	27
2.1 Materialien	27
2.1.1 Chemikalien	27
2.1.2 Primer	27
2.1.3 Untersuchungsmaterial	28
2.1.4 Geräte	28
2.1.5 Sonstige Materialien	29
2.2 Methoden	30
2.2.1 Zellkultur	30
2.2.1.1 Zellen	30
2.2.1.2 Hypoxiekammer	30
2.2.1.3 RNA-Extraktion	31

2.2.1.4	RNA-Messung	32
2.2.1.5	cDNA-Synthese	32
2.2.1.6	RT-PCR	33
2.2.2	Vorhofgewebe.....	36
2.2.2.1	Patienten	36
2.2.2.2	Probenentnahme	36
2.2.2.3	RNA-Extraktion.....	36
2.2.2.4	cDNA-Synthese	37
2.2.2.5	RT-PCR	37
2.2.3	Statistik	38
3.	Ergebnisse	40
3.1	Klinische Patientencharakteristika.....	40
3.2	Zellkultur.....	42
3.3	Nachweis von mRNA von HIF-1 α , VEGF-B, CytOx-4.1, -4.2 in intraoperativ gewonnenen Biopsien des rechten Vorhofes.....	43
4.	Diskussion	55
4.1	Regulatorische Funktion von HIF-1 α	57
4.2	VEGF	58
4.3	CytOx Isoformen	59
4.4	Klinische Relevanz	63
4.4.1	Lipide.....	64
4.4.2	Diabetes mellitus	66
4.4.3	Vorhofdehnung	67
4.5	Perspektiven der Therapie.....	67
4.6	Stellenwert der Isoform 4.2 in der Pathogenese des VHF's	68
5.	Zusammenfassung.....	75
6.	Summary	77
7.	Literaturverzeichnis.....	79
Anhang	94
	Liste akademischer Lehrer	95
	Danksagung.....	96

Abkürzungsverzeichnis

A

ACE *Angiotensin-converting-enzyme*
ADP *Adenosindiphosphat*
AMP *Adenosinmonophosphat*
AMPK *AMP-aktivierte Proteinkinase* 18
AP *Angina Pectoris*
ARNT *Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator*
ATP *Adenosintriphosphat*
AV *Atrioventrikular*

B

BCL *B-cell lymphoma*
BMI *Body Mass Index*
BNIP *B-Cell-lymphoma interacting protein*

C

cDNA *complementary DNA*
Cox/COX *Gen der Cytochrom-c-Oxidase*
CRP *C-reaktives Protein*
CT *Cycle threshold*
CTGF *Connective tissue-growth-factor*
CXXC5 *CXXC Finger Protein 5*
CytOx *Cytochrom-C-Oxidase*

D

DAD *Delayed Afterdepolarization*
DMEM *Dulbeccos modifiziertes Eagles-Medium*
DNA *Desoxyribonukleinsäure*
DPP *Dipeptidyl-Peptidase*

E

EAD *Early Afterdepolarization*
EDTA *Ethylendiamintetraacetat*
EKG *Elektrokardiogramm*
EPAS *endotheliale Per-Arnt-Sim Domäne*
EPO *Erythropoetin*
ERK *Extracellular-signal-related kinase*
ETC *Electron transmission chain*

F

FADH₂ *Flavinadenindinukleotid*
FBS *fötales Rinderserum*
FIH *HIF hemmender Faktor*

H

HDL *High density lipoprotein*
HIF-1 α *Hypoxieinduzierter Faktor 1 α*
HMG-CoA *3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A*
HO *Hämoxygenase*
HRE *Hypoxia responsive element*

I

IL *Interleukin*

J

JNK *c-Jun N-terminal kinase*

K

KHK *koronare Herzkrankheit*

L

LDL *Low density lipoprotein*

M

MIM *Innere Mitochondrienmembran*

miRNA *micro RNA*

MMP *Matrixmetalloprotease*

N

NAD(P)H *Nicotinamid Adenin Dinucleotid*

NADH *Nikotinamidadenindinukleotid*

NF *Nuclear factor*

NO *Stickstoffmonoxid*

NOX *NAD(P)H-Oxidase*

O

OCR *Oxygen consumption rate*

ODD *oxygen dependent degradation*

ORE *Oxygen-responsive-element*

P

PBS *Dulbeccos phosphatgepufferte Kochsalzlösung*

PCR *Polymerasekettenreaktion*

PDGF *Platelet-derived growth-factor*

PDH *Pyruvat Dehydrogenase*

PDK *Pyruvat Dehydrogenase Kinase*

PIGF *Placental growth factor*

R

RBPJ *Recombination Signal Binding Protein For Immunoglobulin Kappa J Region*

Redox *Reduktion-Oxidation*

RMR *Resting metabolic rate*

RNA *Ribonukleinsäure*

ROS *Reaktive Sauerstoffspezies*

RT *Realtime*

RYR *Ryanodinrezeptor*

S

SERCA-Pumpen *Sarkoplasmatische Kalziumpumpe*

SSO *Sequenzspezifische Oligonukleotide*

T

Taq *Thermus aquaticus*

TGF *Transforming growth factor*

TNF *Tumornekrosefaktor*
TNFAIP *TNF induziertes Protein*
TRIS *Tris(hydroxymethyl)-aminomethan*

V

VEGF *Vascular endothelial growth factor*
VHF *Vorhofflimmern*
VHL *Von Hippel Lindau*

Z

Z.n. *Zustand nach*

Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1:** Pathophysiologie von VHF, VHF wird durch Extrasystolen und Arrhythmien initiiert. Wenn diese Trigger auf ein vulnerables Substrat treffen, welches durch verminderte Refraktärzeit, AP-Dauer, gestörte Erregungsleitung und strukturelle Veränderungen definiert ist, resultiert eine Aufrechterhaltung mit der Folge von strukturellem, elektrophysiologischem und kontraktilen Remodeling. Zu den Einflussfaktoren auf diesen Prozess zählen das vegetative Nervensystem und der Kalziumstoffwechsel..... 13
- Abbildung 2:** Atmungskette. Die Elektronentransportkette besteht aus 4 Komplexen. Die Komplexe erzeugen durch Translokationen von Protonen einen Gradienten über der inneren Mitochondrienmembran, durch welchen Komplex V, die ATP-Synthase, angetrieben wird. Die Elektronen, die durch NADH und FADH₂ aus dem Citratzyklus eingeschleust werden, werden durch Komplex IV an molekularen Sauerstoff gebunden und es entsteht H₂O. Die ATP-Synthase stellt ATP her, welches der Energieversorgung der Zelle dient. Durch verschiedene Regulationsmechanismen passt sich die Atmungskette dem Bedarf und bioenergetischen Zustand der Zelle an. Es handelt sich um eine schematische Darstellung der in der oxidativen Phosphorylierung involvierten Enzyme (Vogt et al., 2018). 22
- Abbildung 3:** PCR-Platte, in den Zeilen a-d wurde die cDNA der Kontrollproben vorgelegt, in den Zeilen e-h die cDNA der Proben aus der Hypoxiekammer. Die Spalten 1 und 12 wurden leer belassen. Dazwischen erfolgten jeweils Doppelbestimmungen der Primer für β -Actin (Zeile 2,3), HIF-1 α (Zeile 4,5), VEGF-B (Zeile 6,7), COX 4.1 (Zeile 8,9) und COX4.2 (Zeile 10,11)..... 35
- Abbildung 4:** PCR-Platte, in den Zeilen b-g wurde die cDNA aus dem Myokard von 6 Patienten vorgelegt. Die Spalten 1 und 12 wurden leer belassen. Dazwischen erfolgten jeweils Doppelbestimmungen der Primer für β -Actin (Zeile 2,3), HIF-1 α (Zeile 4,5), VEGF-B (Zeile 6,7), COX 4.1 (Zeile 8,9) und COX4.2 (Zeile 10,11). In Zeile 12 erfolgte eine Negativkontrolle mit RNase freiem Wasser..... 38
- Abbildung 5:** Die normalisierten mRNA-Expressionen von HIF-1 α , VEGF-B, CytOx4, Isoform1, und CytOx4, Isoform 2, der Zellkultur bei Raumluft (n=10) und der mit 8-stündiger Hypoxiebehandlung (n=11) wurden gegenübergestellt. Signifikanz

der Expression von HIF ($p=0,003$) und der Expression von CytOx4, Isoform 2, ($p=0,037$) nach Mann-Whitney-U-TestTM. (VEGF: $p=0,307$, 4.1 $p=0,504$)..... 42

Abbildung 6: Die normalisierten mRNA-Expressionen von HIF-1 α und VEGF-B der Patientengruppe mit Sinusrhythmus ($n=13$) und der mit VHF ($n=7$) wurden gegenübergestellt. Ausgeschlossen wurden Patienten mit Diabetes mellitus. Keine Signifikanz nach Mann-Whitney-U-TestTM. (HIF $p=0,874$, VEGF $p=0,874$)..... 43

Abbildung 7: Die normalisierten mRNA-Expressionen von HIF-1 α und VEGF-B der Patientengruppe mit 0-1-Gefäß-KHK ($n=11$) und der mit 2-3-Gefäß-KHK ($n=14$) wurden gegenübergestellt. Ausgeschlossen wurden Patienten mit Diabetes mellitus. Keine Signifikanz nach Mann-Whitney-U-TestTM. (HIF $p=0,180$, VEGF= $0,763$)..... 44

Abbildung 8: Die normalisierten mRNA-Expressionen von HIF-1 α und VEGF-B der Patientengruppe mit Sinusrhythmus ($n=4$) und der mit VHF ($n=4$) wurden gegenübergestellt. Ausgeschlossen wurden Patienten mit Diabetes mellitus und Patienten mit einer 2- oder 3-Gefäß-KHK. Keine Signifikanz nach Mann-Whitney-U-TestTM. (HIF $p=0,921$, VEGF $p=0,306$) 45

Abbildung 9: Die normalisierten mRNA-Expressionen von CytOx 4, Isoform 1, und CytOx 4, Isoform 2, der Patientengruppe mit akuter Hypoxie (VEGF/HIF <1) ($n=11$) und der mit chronischer Hypoxie (VEGF/HIF >1) ($n=14$) wurden gegenübergestellt. Keine Signifikanz nach Mann-Whitney-U-TestTM. (Cox4.1 $p=0,978$, Cox4.2 $p=0,119$) 46

Abbildung 10: Die normalisierten mRNA-Expressionen von CytOx 4, Isoform 1, und CytOx 4, Isoform 2, sowie den Quotienten der beiden Isoformen der Patientengruppe mit Sinusrhythmus ($n=13$) und der mit VHF ($n=7$) wurden gegenübergestellt. Ausgeschlossen wurden Patienten mit Diabetes mellitus. Nach Mann-Whitney-U-TestTM signifikante Unterschiede der CytOx 4.1 Expression ($p=0,006$) und des Quotienten 4.2/4.1 ($p=0,007$). (Cox4.2 $p=0,267$) 47

Abbildung 11: Die normalisierten mRNA-Expressionen von CytOx 4, Isoform 1, und CytOx 4, Isoform 2, der Patientengruppe mit 0-1-Gefäß-KHK ($n=11$) und der mit 2-3-Gefäß-KHK ($n=14$) wurden gegenübergestellt. Ausgeschlossen wurden Patienten mit Diabetes mellitus. Keine Signifikanz nach Mann-Whitney-U-TestTM. (Cox4.1 $p=0,529$, Cox4.2= $0,978$) 48

Abbildung 12: Die normalisierten mRNA-Expressionen von CytOx 4, Isoform 1, und CytOx 4, Isoform 2, der Patientengruppe mit Sinusrhythmus ($n=4$) und der mit

VHF (n=4) wurden gegenübergestellt. Ausgeschlossen wurden Patienten mit Diabetes mellitus und Patienten mit einer 2- oder 3-Gefäß-KHK. Keine Signifikanz nach Mann-Whitney-U-TestTM. (Cox 4.1 p=0,152, Cox 4.2 p=0,209)

..... 49

Abbildung 13: Darstellung linearer Regressionen der unterschiedlichen Subgruppen mit Sinusrhythmus und VHF. Die Expression der Isoform 2 der CytOx wurde in Abhängigkeit vom linksatrialen enddiastolischen Durchmesser aufgetragen, welcher präoperativ echokardiographisch bestimmt wurde. In der Gruppe mit Sinusrhythmus finden wir eine Korrelation von R=0,253 mit einer Power von 0,109. In der Gruppe mit VHF finden wir eine Korrelation von R=0,296 mit einer Power von 0,063. 50

Abbildung 14: Die normalisierten mRNA-Expressionen von HIF-1 α , VEGF-B, CytOx 4, Isoform 1, und CytOx 4, Isoform 2, der Patientengruppe ohne präoperative Angina Pectoris-Symptomatik (n=13) und der mit Angina Pectoris-Symptomatik (n=11) wurden gegenübergestellt. Ausgeschlossen wurden Patienten mit Diabetes mellitus. Signifikanz der Expression von VEGF-B (p= 0,024) nach Mann-Whitney-U-TestTM. (HIF p=0,354, Cox4.1 p=0,183, Cox4.2 p=0,202) 51

Abbildung 15: Die normalisierten mRNA-Expressionen von HIF-1 α , VEGF-B, CytOx 4, Isoform1, und CytOx 4, Isoform 2, der Patientengruppe ohne Statintherapie (n=11) und der mit Statintherapie (n=13) wurden gegenübergestellt. Ausgeschlossen wurden Patienten mit Diabetes mellitus. Keine Signifikanz nach Mann-Whitney-U-TestTM; Tendenz (#p= 0,072) der Expression von CytOx 4, Isoform 2, zu erkennen. (HIF p=0,871, VEGF p=0,772, Cox4.1 p=0,271)..... 52

Abbildung 16: Die normalisierten mRNA-Expressionen von HIF-1 α , VEGF-B, CytOx 4, Isoform1, und CytOx 4, Isoform 2, der Patientengruppe ohne Diabetes mellitus (n=25) und der mit Diabetes mellitus (n=16) wurden gegenübergestellt. Keine Signifikanz nach Mann-Whitney-U-TestTM. (HIF p=0,329, VEGF p=0,267, Cox4.1 p=0,204, Cox4.2 p=0,329)..... 53

Abbildung 17: Die normalisierten mRNA-Expressionen von HIF-1 α , VEGF-B, CytOx 4, Isoform 1, und CytOx 4, Isoform 2 der Patientengruppe mit Sinusrhythmus (n=9) und der mit VHF (n=3) der Patienten mit Diabetes mellitus wurden gegenübergestellt. Nach Mann-Whitney-U-TestTM keine signifikanten Unterschiede, jedoch eine Tendenz der Expression der CytOx 4.1 (p=0,064). (HIF p=0,276, VEGF p=0,460, Cox 4.2 p=0,683)..... 54

Abbildung 18: Bei Hypoxie bindet der HIF Komplex an HRE-Elemente der DNA.

Dadurch kommt es zu einer Aktivierung von Genen, welche für eine Adaptierung an hypoxische Bedingungen zuständig sind (1). Bei normoxischen Bedingungen wird HIF1a durch Proteasome degradiert (2), nachdem es sauerstoffabhängig hydroxyliert wurde (3). Diese Hydroxylierung ermöglicht eine Bindung des VHL-Komplexes an das HIF-1a Protein (4) (Diese Abbildung ist aus: Eckert et al., 2019). 57

Abbildung 19: Potentieller Kompensationsmechanismus bei VHF. Bei VHF entstehen

vermehrt toxische ROS (1) und es besteht ein gestörter mitochondrialer Energiemetabolismus (2). Durch die relative Hypoxie bei VHF kommt es zu einer verminderten Expression der Isoform 4.1 und vermehrten Expression der Isoform 4.2 der CytOx (3, 4). Aufgrund der vermehrten Expression der Isoform 4.2 entstehen weniger ROS (5) und die Energiegewinnung der Atmungskette wird effizienter (6). Die geringere Menge an zytotoxischen ROS könnte partiell eine weitere Myokardschädigung verhindern (7). 70

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Chemikalien	27
Tabelle 2: Primer (beta-Actin, HIF-1 α , VEGF-B, COX4.1, COX4.2).....	28
Tabelle 3: Geräte und Materialien	28
Tabelle 4: Sonstige Materialien	29
Tabelle 5: Zusammensetzung der Proben pro Reaktionsgefäß.....	32
Tabelle 6: Reaktionsprotokoll cDNA-Synthese	33
Tabelle 7: Zusammensetzung pro Vertiefung der Platte	34
Tabelle 8: RT-PCR, Reaktionsprotokoll 1	35
Tabelle 9: RT-PCR, Reaktionsprotokoll 2.....	35
Tabelle 10: Lyseprotokoll	37
Tabelle 11: Klinische Patientencharakteristika.....	40

1. Einleitung

1.1 Vorhofflimmern

1.1.1 Epidemiologie

Vorhofflimmern (VHF) ist die häufigste anhaltende Herzrhythmusstörung beim Erwachsenen. Die Prävalenz beträgt rund 2,3% in der Bevölkerung Deutschlands und die Inzidenz steigt stetig. Die Prävalenz in Europa hat sich innerhalb der letzten zehn Jahre mehr als verdoppelt (Zoni-Berisso et al., 2014). Das Alter ist ein wichtiger Risikofaktor für VHF und sorgt für Folge- und Begleiterkrankungen. Aufgrund der alternden Bevölkerung steigen neben der Inzidenz auch die Morbidität und Mortalität und machen VHF damit zu einer wesentlichen medizinischen und sozioökonomischen Herausforderung (Zoni-Berisso et al., 2014, Neuzner und Pitschner, 2000). Patienten mit VHF verursachen 5-10-fach höhere Kosten als Patienten mit normalem Herzrhythmus (Andrade et al., 2014, Neuzner und Pitschner, 2000). Um einen Fortschritt der Therapieoptionen zu erreichen, müssen grundlegende initiiierende und aufrechterhaltende Mechanismen des VHF verstanden werden (Heijman et al., 2016).

1.1.2 Definition, Pathomechanismen

VHF bezeichnet ungerichtete Bewegungsabläufe der Vorhöfe, welche im Elektrokardiogramm (EKG) zu Flimmerwellen mit einer Frequenz von 300-600bpm führen und einen arrhythmischen Puls erzeugen (Haverkamp, 2018). Die Entstehung dieser Erregung wird durch verschiedene Mechanismen beschrieben. VHF tritt auf, wenn Trigger auf ein vulnerables Substrat treffen. Diese Trigger können Tachy- oder Bradyarrhythmien sein. Meist sind es jedoch atriale Extrasystolen, von ektopen Foki ausgehend, welche durch verspätete Repolarisation verfrühte Nach-Depolarisationen (Early Afterdepolarisations, 'EADs') auslösen (Lau et al., 2017). Weitere Trigger sind verspätete Nach-Depolarisationen (Delayed Afterdepolarisations, 'DADs'), die durch einen veränderten Kalziumstoffwechsel atriale Extrasystolen bedingen (Voigt et al., 2014, Haverkamp, 2018, Heijman et al., 2014). Das vulnerable Substrat ist meist durch Komorbiditäten wie Herzinsuffizienz, ein alterndes Herz oder Hypertonie bedingt (Heijman et al., 2014). In der Folge kommt

es zu einem strukturellem Remodeling, welches durch Fibrosierung, Dilatation, Hypertrophie und veränderte Zellkommunikation die Vulnerabilität des Gewebes verstärkt. Verkürzte Aktionspotentialdauer und verlängerte Refraktärzeit resultieren und bewirken eine Aufrechterhaltung von VHF (Andrade et al., 2014). Zu den Hauptmechanismen der Entstehung und Aufrechterhaltung von VHF gehört das Prinzip des „Multiple Wavelet Re-Entry“. Es beschreibt, dass Erregungen, die durch langsame Erregungswellen die Refraktärperiode des Gewebes überschreiten, zu Kreiserregungen führen können. Diese Erregungen verzweigen und breiten sich durch Inhomogenitäten des Gewebes aus, sodass es zu ungerichteten Erregungen im gesamten Vorhof kommt (Andrade et al., 2014, Neuzner und Pitschner, 2000). „Re-Entry“-Kreise entstehen um Narben und Hindernisse im Gewebe, wenn das erregte Gewebe vor Eintreffen des „Re-Entry“- Kreises wieder erregbar ist (Heijman et al., 2014). Außerdem wird ein Mechanismus beschrieben, bei dem sich eine Erregung von einem ektopen Fokus ausgehend spiralförmig, als sogenannter Rotor, ausbreitet (Pandit und Jalife, 2013, Zykov et al., 2017). Bei diesem Fokus kann es sich sowohl um eine besonders schwach leitende Region, als auch um eine besonders schnell leitende Region handeln (Zykov et al., 2017). Das Gewebe um die Pulmonalvenen scheint für die Entstehung von ektopen Foki zu prädestinieren. „Re-Entry“-Kreise können aufgrund der verzweigten Gewebestruktur und einer kürzeren Refraktärperiode entstehen (Heijman et al., 2014). Alle Mechanismen haben eine ungerichtete Vorhoferregung mit unregelmäßiger Überleitung zur Folge. Über die präzisen Mechanismen und die Wertigkeit der einzelnen Prinzipien bestehen jedoch nach wie vor Uneinigkeit (Pandit und Jalife, 2013).

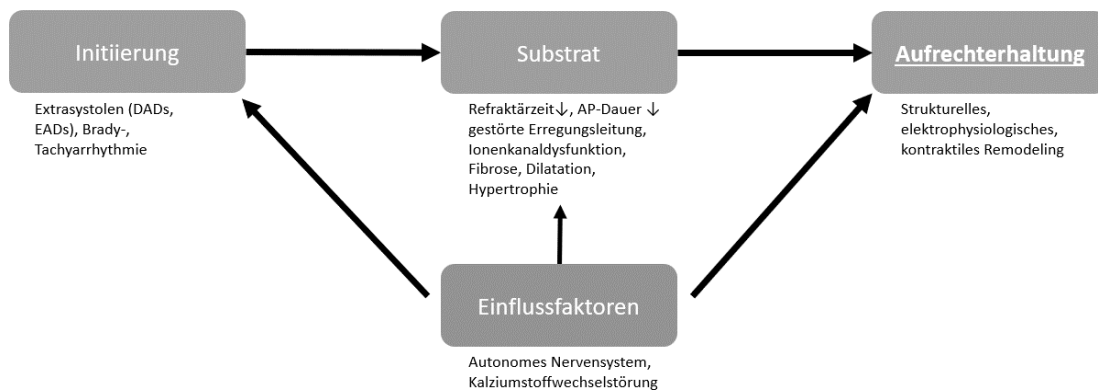


Abbildung 1: Pathophysiologie von VHF, VHF wird durch Extrasystolen und Arrhythmien initiiert. Wenn diese Trigger auf ein vulnerables Substrat treffen, welches durch verminderte Refraktärzeit, AP-Dauer, gestörte Erregungsleitung und strukturelle Veränderungen definiert ist, resultiert eine Aufrechterhaltung mit der Folge von strukturellem, elektrophysiologischem und kontraktiler Remodeling. Zu den Einflussfaktoren auf diesen Prozess zählen das vegetative Nervensystem und der Kalziumstoffwechsel.

VHF hat strukturelle und elektrophysiologische Veränderungen des Myokards zur Folge. Ein Indikator dafür ist die Tatsache, dass ein erfolgreiches Terminieren des VHF mit der Zeit des Andauerns unwahrscheinlicher wird. In 30-50% der Fälle terminiert das VHF spontan, nach 12 Tagen beträgt der Anteil der Vorhofflimmer-Fälle, welche spontan remittieren, jedoch nur noch 2% (Neuzner und Pitschner, 2000). Die Veränderungen des Gewebes werden als Remodeling beschrieben und zeichnen sich durch verschiedene Mechanismen aus, welche zur Initiierung und Aufrechterhaltung des VHF beitrugen. Mit **strukturellem Remodeling** des Vorhofgewebes beschreibt man eine Fibrosierung, welche zu unterschiedlichen Leitungsgeschwindigkeiten im Vorhof, sowie veränderten Zell-zu-Zell-Kontakten und atrialer Dehnung führen kann. Dieses Remodeling ist abhängig vom Kalzium-Stoffwechsel, da eine Verminderung des Kalziums im Myokard zu geringerem Remodeling führt (Andrade et al., 2014, Neuzner und Pitschner, 2000). Der Kalziumstoffwechsel spielt auch beim **elektrischen Remodeling** eine zentrale Rolle. Durch erhöhte Kalzium- und Kaliumströme verkürzt sich die Aktionspotentialdauer und die Repolarisationszeit (Schotten et al., 2006). Das **metabolische Remodeling** bezieht sich auf einen alternierenden Stoffwechsel und ein verändertes Energieangebot. Durch das Flimmern entsteht ein Sauerstoffdefizit, welches verschiedene strukturelle, elektrische und auch metabolische Folgen hat. Diese Hypoxie ist am ehesten durch einen erhöhten Sauerstoffverbrauch bei gleichzeitig nicht ausreichend erhöhtem Angebot bedingt. Es besteht also eine relative Hypoxie (White et al., 1982, van Bragt et al., 2014). Veränderungen im Glukosestoffwechsel und eine veränderte Zellatmung dienen der Anpassung, haben

jedoch die Aufrechterhaltung des VHF zur Folge (van Bragt et al., 2014). Die veränderte Atmung während des VHF bedingt eine vermehrte Produktion von reaktiven Sauerstoffradikalen, welche das Myokard zusätzlich schädigen (Emelyanova et al., 2016). Die strukturellen und elektrophysiologischen Veränderungen führen insgesamt zu verkürzter Aktionspotentialdauer, verminderter Refraktärzeit und einer schlechteren Anpassung bei Belastung (Haverkamp, 2018).

1.1.3 Folgeerkrankungen

VHF resultiert in einem Morbiditäts- und Mortalitätsanstieg und führt zu einer gesundheitsökonomischen Belastung. Die gesundheitsökonomischen Auswirkungen beziehen sich sowohl auf die Behandlungskosten und Krankenhausaufenthalte, sowie auf Pflegeaufwand und Produktivitätsverluste (Haverkamp, 2018). Hierbei ist zu berücksichtigen, dass Patienten mit VHF häufig sowohl ein höheres Alter als auch eine Multimorbidität aufweisen (Neuzner und Pitschner, 2000). Eine erhöhte Mortalität ist bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit (KHK), Myokardinfarkt oder Herzinsuffizienz mit begleitendem VHF beschrieben. Die Wahrscheinlichkeit thromboembolischer Ereignisse steigt signifikant an, so erhöht sich das Schlaganfallrisiko bei VHF ohne Antikoagulation um das Fünffache (Pistoia et al., 2016). In den letzten fünf Dekaden ist laut der Framingham-Studie die Zahl der durch VHF verursachten Schlaganfälle durch Antikoagulation um 75% zurückgegangen. Der CHA₂DS₂-VASc-Score (Herzinsuffizienz, Hypertonie, Alter >75, Diabetes mellitus, Z.n. Schlaganfall, Z.n. vaskulären Ereignissen, Alter >65, Geschlecht) wird zur Einschätzung des Risikos von Schlaganfällen angewendet und empfiehlt eine Antikoagulation ab einem Score von eins. Durch VHF kann es bei linksventrikulärer Dysfunktion außerdem zur Verschlechterung der hämodynamischen Situation kommen und bei länger anhaltenden Tachyarrhythmien kann eine Tachykardiomyopathie resultieren (Haverkamp, 2018). Ebenfalls besteht ein Einfluss des VHF auf die Zunahme von kognitiven Dysfunktionen und die Häufigkeit vaskulärer Demenzen (Bruijn et al., 2015).

1.1.4 Ätiologie

Die Ätiologie von VHF ist vielfältig und kann in kardiale und nicht-kardiale Ursachen eingeteilt werden. Laut der Framingham-Heart-Studie ist das fortgeschrittene Lebensalter

einer der wichtigsten unabhängigen Risikofaktoren für VHF. Ab einem Alter von 60 verdoppelt sich die Wahrscheinlichkeit an VHF zu erkranken pro Lebensdekade. Der Alterungsprozess geht mit strukturellen Veränderungen des Herzmuskels einher, welche zu Initiation und Progression von VHF führen können (Andrade et al., 2014). Männliches Geschlecht, ein zu hoher Body-Mass-Index (BMI), Körpergröße und psychosoziale Einflüsse, sowie genetische Prädisposition stellen weitere Risikofaktoren dar (Haverkamp, 2018). Die das Herz-Kreislauf-System betreffenden Krankheiten stellen eine der wichtigsten Ursachen von VHF dar. Laut der Framingham-Heart-Studie treten bereits bei hochnormalen Blutdruckwerten Risiken auf. Bei einem hochgradigen arteriellen Hypertonus kommt es zu einer Risikoerhöhung um den Faktor 1,5. Eine klinisch apparente Herzinsuffizienz erhöht das Risiko an VHF zu erkranken um das Fünffache, vor allem durch Vergrößerung des linksatrialen Diameters. Eine Klappenerkrankung resultiert in einem zweifach höheren Risiko. Außerdem stellen andere Rhythmusstörungen, Kardiomyopathien und der Zustand nach herzchirurgischen Eingriffen weitere Risiken dar (Neuzner und Pitschner, 2000, Haverkamp, 2018). Zu den nicht-kardial assoziierten Erkrankungen gehören Diabetes mellitus, hyperthyreote Erkrankungen, chronische Lungen- und Nierenerkrankungen, obstruktives Schlafapnoesyndrom, Nikotinabusus und Alkoholkonsum (Neuzner und Pitschner, 2000, Haverkamp, 2018, Andrade et al., 2014, European Society of Cardiology (ESC), Deutsche Gesellschaft für Kardiologie (DGK), 2016).

1.1.5 Therapie

Die Behandlung des VHF besteht neben der Antikoagulation zur Prävention eines thromboembolischen Ereignisses aus den zwei Säulen Frequenz- und Rhythmuskontrolle. Viele individuelle Parameter entscheiden über die Therapiestrategie. Dazu gehören Kreislaufstabilität, Dauer des Flimmerns, Anzahl der Episoden, Begleiterkrankungen, Alter und die linksventrikuläre Funktionsstörung. Während die Antikoagulation und die Behandlung der Grunderkrankung eine prognostische Verbesserung liefern, sind Frequenz- und Rhythmuskontrolle hauptsächlich symptomatisch therapierend (European Society of Cardiology (ESC), Deutsche Gesellschaft für Kardiologie (DGK), 2016). Im Rahmen dieser Arbeit können jedoch nur einzelne Aspekte hervorgehoben werden.

Bei der Frequenzkontrolle ist zunächst ein Wert von <110 bpm anzustreben. Dies wird je nach Komorbidität und Herzfunktion durch die Medikation von Betablockern, Digitalis, Diltiazem und Verapamil oder einer Kombination der Therapeutika erreicht. Die Rhythmuskontrolle wird bei symptomfreien, hämodynamisch stabilen Patienten nicht mehr zwingend angestrebt (AFFIRM Studie, (Haverkamp, 2018)). Therapeutisch bestehen die Möglichkeiten der medikamentösen Therapie und der elektrischen Kardioversion, sowie interventioneller Verfahren. Es werden medikamentöse Strategien mit Antiarrhythmika der Gruppe I und III, wie Flecainid, SotalolTM und Amiodaron, angewendet. Als kardiochirurgische Optionen zum Erreichen eines Sinusrhythmus können außerdem interventionelle Verfahren durchgeführt werden. Die erste erfolgreiche Operationsmethode stellt die Maze Operation dar. Das chirurgische Vorgehen wurde in der Folgezeit weiter modifiziert. Durch die Entwicklung der Katheterablation der Pulmonalvenen wurde diese jedoch abgelöst (Schotten et al., 2006). Operative Verfahren haben einen geringeren Stellenwert in der Therapie von VHF. In der Herzchirurgie wird im Rahmen von Operationen an der Mitralklappe von Patienten mit VHF häufig eine parallele Ablation der Pulmonalvenen vorgenommen (Vural et al., 2018). Ein experimentelles Verfahren, die Hybridablation, kombiniert chirurgische und kathetergestützte Ablationstherapie und beschränkt sich bisher auf Therapieversager anderer Therapieverfahren (Davies et al., 2017).

1.1.6 Aktuelle Forschungsansätze

Die aktuellen Forschungsansätze zielen alle auf individuellere, spezifischere und effizientere Therapiestrategien ab. Um bei interventionellen Ansätzen wie der Pulmonalvenenablation bessere Erfolge zu erzielen, werden elektroanatomische Merkmale der Atrien charakterisiert. Low-voltage-Areale werden lokalisiert, da sie als Substrat für VHF dienen. Exakte Charakterisierung und gezielte Ablation können so die Therapie verbessern (Kosiuk et al., 2018). Ein weiterer Forschungsansatz betrifft das epikardiale Fettgewebe. Es hat parakrine proinflammatorische und endokrine Funktionen und trägt zur Initiierung und Aufrechterhaltung von VHF bei. Es könnte ein Therapieziel darstellen, welches durch Gewichtsabnahme oder spezifische medikamentöse Therapien zu erreichen ist (Goudis et al., 2018). Ionenkanalveränderungen spielen bei der Entstehung und Aufrechterhaltung von VHF eine bedeutende Rolle. Therapieoptionen beziehen sich vor allem auf den Kalziumstoffwechsel, da dieser sowohl zur Initiation als auch zum Remodeling beiträgt (Andrade et al., 2014, Schotten et al., 2006). Besonders vielversprechend scheint das

Eingreifen in den Metabolismus der Kardiomyozyten zu sein. Während VHF besteht ein bioenergetisches Defizit, welches die Progression wiederum begünstigt (Schwarz et al., 2014, van Bragt et al., 2014, Schotten et al., 2006). Wenn Hypoxie und metabolische Veränderungen begrenzt werden könnten, würde dem VHF das Substrat zur Aufrechterhaltung fehlen (van Bragt et al., 2014, Schwarz et al., 2014, Barth und Tomaselli, 2009). Viele Forschungsschwerpunkte betreffen die genetische Komponente des VHF, welche bisher wenig verstanden ist. Dadurch, dass Medikamente und auch interventionelle Therapien so unterschiedliche Erfolge liefern, ist eine Beteiligung der genetischen Komponente wahrscheinlich. Des Weiteren gibt es Computermodelle zur individuellen Ablationsplanung, Stammzellversuche zur effizienteren präklinischen Entwicklung von Medikamenten werden durchgeführt. In Kombination liefern diese Ansätze eine individuellere Therapiemöglichkeit bei VHF (Barichello et al., 2018). Weiterhin scheinen nicht nur gering leitende Zellen das VHF zu verursachen, sondern auch besonders schnell leitende Areale. Sogenannte „Fast Propagation Regions“ können Ursprung von kreisenden Erregungen sein und weisen eine veränderte Ionenkanalausstattung infolge des Remodelings bei VHF auf. Können diese Areale lokalisiert und ablatiert werden, erfolgt eine erfolgreiche Terminierung des VHF (Zykov et al., 2017).

1.1.7 Ausblick, Möglichkeiten

In Bezug auf aktuelle Forschungsthemen bleiben viele Fragen weiterhin offen. Es ist essentiell, die grundlegenden elektrophysiologischen, anatomischen und chemischen Prozesse in der Entstehung und Aufrechterhaltung von VHF zu verstehen, um durch neue computerbasierte Methoden innovative und individuelle Ansätze zu finden (Heijman et al., 2016, Barichello et al., 2018). Im Hinblick auf die Thematik dieser Arbeit liefert die bioenergetische Betrachtung einen neuen Aspekt.

1.2 Stoffwechsel der Herzmuskelzelle

1.2.1 Kalzium-Stoffwechsel

Im Zuge von VHF kommt es zu elektrophysiologischen Veränderungen im Ionenhaushalt. Eine wichtige Rolle in der Entstehung und Aufrechterhaltung von VHF spielt eine

gestörte intrazelluläre Kalziumhomöostase (Haverkamp, 2018). Während eines physiologischen Aktionspotentials ist der Kalziumstrom zuständig für die schnelle Depolarisation in AV- und Sinusknoten und führt zur Kontraktion der Myozyten. Um eine Kontraktion zu initiieren, kommt es zu einem Kalziumeinstrom durch L-Typ Kalziumkanäle in die Zelle, sowie zu einer Kalzium-induzierten Kalziumfreisetzung durch die Aktivierung von Ryanodinrezeptoren (RyR2) auf der Membran des sarkoplasmatischen Retikulums. Während der Plateauphase des Aktionspotentials kommt es zu einer ATP-abhängigen Aktivierung von sarkoplasmatischen Kalzium-Pumpen (SERCA-Pumpen), welche Kalzium zurück in die sarkoplasmatischen Retikula befördern und somit eine Repolarisation bewirken. Die SERCA-Pumpen werden durch Phospholamban, ein Membranprotein, reguliert. Kalzium wird außerdem durch $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Pumpen extrazellulär befördert (Boron und Boulpaep, 2012). Durch VHF kommt es zu Veränderungen des Stoffwechsels, welche zu verfrühten Repolarisationen und verkürzter Aktionspotentialdauer führen. Zeitlich fehlgesteuerte Aktivität in den Vorhöfen durch zu frühe oder späte Depolarisationen kann durch spontane Kalziumfreisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum bedingt sein. Phosphorylierung von Ryanodin-Rezeptoren oder deren Dysregulation kann diese Freisetzung mit der Folge von fokalen ektopten Erregungen verursachen (Andrade et al., 2014, Heijman et al., 2016). Das durch VHF verursachte Remodeling führt zu einer Veränderung der Ionenkanalausstattung der Zellen, es finden sich vermehrt Ca^{2+} und K^+ Kanäle. Diese Veränderung verursacht wiederum verfrühte Repolarisationen und verkürzte Aktionspotentialdauer, sodass das VHF aufrechterhalten wird (Andrade et al., 2014). Insgesamt ist festzustellen, dass vermindertes Kalzium das Remodeling begrenzt (Schotten et al., 2006). Ein weiterer Faktor im Kalzium-Stoffwechsel ist das autonome Nervensystem. Sympathische und parasympathische Einflüsse erhöhen durch Acetylcholin und G-Protein-gekoppelte Signalwege die Ausschüttung von Kalzium aus dem sarkoplasmatischen Retikulum durch L-Typ-Kalziumkanäle (Andrade et al., 2014, Schotten et al., 2006). Weitere klinische Bezüge der veränderten Kalziumhomöostase sind niedrige Kalziumspiegel bei Ischämie in der Herzmuskelzelle, wodurch sich das Aktionspotential verkürzt. Außerdem kommt es bei Herzinsuffizienz zu einer Dysregulation der SERCA und somit Dysregulation des Kalziumstoffwechsels (Barth und Tomaselli, 2009). Die Beeinflussung des Kalziumhaushaltes bietet daher verschiedene therapeutische Ziele, um die Entstehung und Aufrechterhaltung des VHF zu verhindern (Schotten et al., 2006). Bei Therapie mit Kalziumantagonisten zeigten sich die strukturellen Umbauprozesse im Atrium bei VHF vermindert (Neuzner und Pitschner, 2000).

1.2.2 Proteinkinasen

Verschiedene Proteinkinasen spielen eine Rolle bei der Entstehung von VHF. Die Calmodulin-abhängige-Proteinkinase-2 wird adrenerg aktiviert und verursacht Hyperphosphorylierung des Ryanodinrezeptors-2 und stellt eine Ursache für ein chronisches VHF dar (Andrade et al., 2014, Schotten et al., 2006). Außerdem bewirkt ein erhöhter Kalziumspiegel durch Phosphorylierungen von Proteinkinasen frühe und späte spontane Depolarisationen (Andrade et al., 2014). Die AMP-aktivierte Proteinkinase (AMPK) ist essenziell für den Metabolismus im Atrium, da sie als Stresssensor dient und einem VHF vorbeugt. Sie wird bei erhöhtem Energiebedarf aktiviert und führt zu einem effizienteren Stoffwechsel. Bei VHF konnten erhöhte AMPK-Spiegel nachgewiesen werden (Harada et al., 2017, Schotten et al., 2006).

1.2.3 Bioenergetischer Effekt

Eine Herzinsuffizienz geht mit einem beeinträchtigten bioenergetischen Zustand des Myokards einher. Dieses Defizit zeigt sich in einer reduzierten Enzymaktivität von zellulären Kinasen, einem verminderten ATP Gehalt, beeinträchtigter Sauerstoffutilisation und Prädisposition für VHF. Auch die durch VHF verursachte elektrische Instabilität führt zu einer Veränderung des Metabolismus. Während die Fettsäureoxidation herunterreguliert wird, ist die Glukoseutilisation andererseits hochreguliert. Im Tiermodell konnte initial ein erhöhter Energiebedarf bei VHF nachgewiesen werden. Bei einem ATP-Defizit kommt es außerdem zur Depolarisation durch ATP-sensitive Kaliumkanäle, wodurch Re-Entry-Mechanismen begünstigt werden. Der metabolische Stress im Vorhof führt zu einem verminderten Kalziumstrom, einer reduzierten Kalziumspeicherung und verminderter Kontraktilität mit der Folge eines verkürzten Aktionspotentials und einer Hypokontraktilität. Diese Effekte können durch die AMPK-Aktivität zum Teil antagonisiert werden. Eine Studie zeigte, dass vor allen Dingen ein metabolisches Remodeling bei VHF einsetzt und den ganzen Energiemetabolismus der Zelle beeinflusst. Diese Tatsache bietet eine neue therapeutische Strategie bei strukturellen Herzerkrankungen, da im Falle eines Ausbleibens des elektrophysiologischen Remodelings die nebenwirkungsreiche Rhythmuskontrolle ergänzt werden könnte. Hierzu müssen die pathophysiologischen Mechanismen des metabolischen Stresses bei VHF vollständig verstanden werden (Barth und

Tomaselli, 2009, Harada et al., 2017, Emelyanova et al., 2016, Vogt et al., 2016, Vogt et al., 2018).

1.2.4 Oxidativer Stress

Während einer rhythmischen Herzaktion benötigt das Herz eine große Menge ATP und somit Sauerstoff. Bei VHF wird dieser Bedarf noch gesteigert, sodass es bei Ausschöpfung der koronaren Reserve zu relativer Hypoxie kommt. Umso mehr wird der Bedarf bei koronarer Herzkrankheit gesteigert, da eine KHK die volle Ausschöpfung der Koronarreserve verhindert. Gerade zu Beginn einer Episode von VHF zeigt sich ein Anstieg von Hypoxie-Indikatoren wie Hypoxie-induzierbarer Faktor 1α (HIF- 1α) und Lactat (van Bragt et al., 2014, Harada et al., 2017). VHF ist aufgrund einer kompensatorischen Herunterregulierung der Elektronentransportkette von einem oxidativen Stress begleitet (Emelyanova et al., 2016). Dies führt zu vermehrter Produktion von reaktiven Sauerstoffradikalen (ROS), einem Nebenprodukt der Atmungskette (Komplex I und III). Im physiologischen Zustand dienen ROS intrazellulären Signalwegen. Bei hypoxischem Stress kommt es zu einem Entkoppeln der Atmungskette, welche die Effizienz der Atmungskette vermindert, jedoch die ROS-Produktion begrenzt (Zorov et al., 2014). Sobald die ROS-Produktion nicht ausreichend begrenzt werden kann, kommt es zu oxidativen zellulären Schäden. Eine Produktion von ROS ist abhängig vom mitochondrialen Membranpotential, ab $\Delta\Psi_m > 140$ mV kann das Superoxid-Anion an Komplex I und III entstehen (Kadenbach et al., 2004). Im alternden Herzen kommt es durch zunehmende Ineffizienz der Atmungskette vermehrt zu Entstehung von ROS (Schwarz et al., 2014, Barth und Tomaselli, 2009). Die Akkumulation der ROS bewirkt einerseits ein strukturelles Remodeling durch Schädigung von Nukleinsäuren, Ionenkanälen und Fibroblasten und andererseits Depolarisationen, die für kardiale Arrhythmien prädestinieren (Barth und Tomaselli, 2009, Harada et al., 2017). Zusammenfassend ist festzustellen, dass VHF durch eine Veränderung des Metabolismus und durch oxidativen Stress eine Progredienz des pathophysiologischen Zustands bedingt. Dies stellt ein wichtiges Forschungs- und Therapieziel dar (van Bragt et al., 2014, Harada et al., 2017, Barth und Tomaselli, 2009, Chen und Zweier, 2014).

1.3 Atmung des Myokards

1.3.1 Mitochondrien, Atmungskette

Das Herz muss sich regelmäßig kontrahieren ohne relevante Energiespeicher zu besitzen. Daher bildet es pro Tag das 15-20-fache des eigenen Gewichts an ATP. Außerdem ist eine enge Kopplung zwischen ATP-Gewinnung und Kontraktion notwendig (Kolwicz et al., 2013). Mitochondrien werden als die Kraftwerke der Zellen bezeichnet, da sie mittels Citratzyklus, oxidativer Phosphorylierung und Fettsäureabbau für die oxidative Energiegewinnung zuständig sind. Sie werden von einer inneren und einer äußeren Membran umgeben. Auf der Matrixseite der inneren Mitochondrienmembran (MIM) befindet sich der Multienzymkomplex der Atmungskette (Komplex I-IV), welcher durch Elektronentransport ein Membranpotential über der inneren Mitochondrienmembran generiert, wodurch die ATP-Synthase (Komplex V) angetrieben wird. Diese synthetisiert, durch das Membranpotential angetrieben, ATP (Buselmaier und Haussig, 2018). Die Elektronen für die Elektronentransportkette kommen aus NADH und FADH_2 aus dem Citratzyklus zur Reduktion von Sauerstoff zu Wasser und Herstellung von ATP (Schwarz et al., 2014). Drei der Komplexe der Atmungskette transportieren Protonen (I: NADH-Dehydrogenase, III: Cytochrom-c-Oxidoreduktase und IV: Cytochrom-c-Oxidase).

Komplex II, die Succinat-Q-Reduktase, enthält die Succinat-Dehydrogenase, welche FADH aus dem Citratzyklus in die Atmungskette schleust, während Komplex I NADH aus dem Citratzyklus erhält. Diese Elektronen werden entlang der Komplexe II und III über Cytochrom c zu Komplex IV (Cytochrom-c-Oxidase) transportiert. Es werden 4 Elektronen auf den molekularen Sauerstoff übertragen, welcher dadurch mit Wasserstoffionen reagiert. Es entsteht somit Wasser. Die Reihe an Redox-Reaktionen, durch welche die Elektronen transportiert werden, setzt Energie frei. Diese wird von Komplex I, III und IV genutzt, um Protonen in den Intermembranraum zu pumpen (Berg et al., 2014, Schwarz et al., 2014).

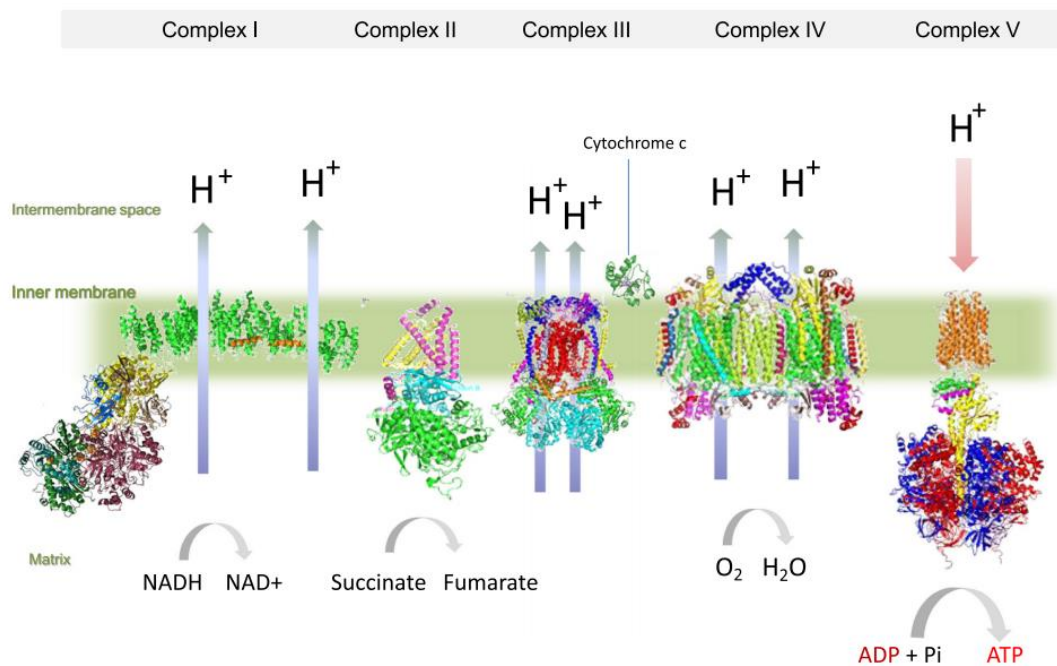


Abbildung 2: Atmungskette. Die Elektronentransportkette besteht aus 4 Komplexen. Die Komplexe erzeugen durch Translokationen von Protonen einen Gradienten über der inneren Mitochondrienmembran, durch welchen Komplex V, die ATP-Synthase, angetrieben wird. Die Elektronen, die durch NADH und FADH₂ aus dem Citratzyklus eingeschleust werden, werden durch Komplex IV an molekularen Sauerstoff gebunden und es entsteht H₂O. Die ATP-Synthase stellt ATP her, welches der Energieversorgung der Zelle dient. Durch verschiedene Regulationsmechanismen passt sich die Atmungskette dem Bedarf und bioenergetischen Zustand der Zelle an. Es handelt sich um eine schematische Darstellung der in der oxidativen Phosphorylierung involvierten Enzyme (Vogt et al., 2018).

1.3.2 Cytochrom-c-Oxidase

Die Cytochrom-c-Oxidase (CytOx), Komplex IV der Atmungskette, ist das terminale Enzym der Atmungskette und setzt molekularen Sauerstoff um (Little et al., 2018). Komplex IV ist der geschwindigkeitsbegrenzende Schritt der aeroben Energiegewinnung, er katalysiert die Reduktion von molekularem Sauerstoff zu Wasser (Berg et al., 2014). Der durch den Protonentransport in der Atmungskette hergestellte elektrochemische Gradient über der inneren Mitochondrienmembran treibt den Rotor der ATP-Synthase an. Die CytOx tritt im physiologischen Zustand als Dimer auf, bei welchem ein Monomer aus 10 regulatorischen, im Nukleus kodierten Einheiten und 3 katalytischen, mitochondrial kodierten Einheiten besteht. Diese drei Untereinheiten bilden das hochkonservierte katalytische Zentrum und enthalten Redox-Zentren. Die Cu-a-Domäne der Untereinheit 2 der CytOx nimmt die Elektronen vom Cytochrom c an. Dadurch wird eine Häm-a-Domäne der Untereinheit 1 der CytOx reduziert, die Elektronen werden weiterhin auf die Cu-b-

Häm-a-Domäne der Untereinheit 1 übertragen. Dort bindet molekularer Sauerstoff und wird zu Wasser reduziert. Während dieser Reaktion werden maximal 8 Protonen in den Intermembranraum gepumpt und erzeugen einen elektrochemischen Gradienten. Die 10 kernkodierten Untereinheiten der CytOx besitzen strukturelle und regulatorische Funktionen (Sinkler et al., 2017, Little et al., 2018, Kadenbach und Hüttemann, 2015).

1.3.3 Untereinheit 4 der Cytochrom-c-Oxidase

Eine besondere Bedeutung für die Atmungsregulation der kernkodierten Untereinheiten besitzt die Untereinheit 4 der CytOx (Horvat et al., 2006). Es konnte gezeigt werden, dass diese Untereinheit bei Säugetieren die einzige Untereinheit ist, die auf Umweltbedingungen reagiert und die somit eine wichtige regulatorische Stellung einnimmt. Sie hat Kontaktstellen zu zwei der katalytischen Untereinheiten und enthält eine ATP-Bindungsstelle (Kocha et al., 2015, Li et al., 2006). Bei hohen ATP/ADP Quotienten wird die CytOx durch Phosphorylierung der Untereinheit, welche durch eine Proteinkinase A erfolgt, allosterisch inhibiert (Sinkler et al., 2017, Napiwotzki und Kadenbach, 1998, Acin-Perez et al., 2011). Von einigen kernkodierten Untereinheiten sind Isoformen bekannt, hierbei haben die Untereinheiten 4.1 und 4.2 eine besondere Bedeutung erlangt (Little et al., 2018, Kadenbach und Hüttemann, 2015). Während die Isoform 1 der Untereinheit 4 der CytOx (4.1) keine Cystein-Gruppen enthält, hat die Isoform 2 der Untereinheit 4 der CytOx (4.2) drei Cystein-Gruppen, welche Disulfidbindungen eingehen können, wodurch Redoxreaktionen, Interaktionen und posttranslationale Modifikationen erfolgen können. Die Regulation der Isoformen geschieht über komplexe Mechanismen, welche hypoxieinduziert und entwicklungsinduziert erfolgen können (Sinkler et al., 2017). Die Isoform 4.1 wird ubiquitär exprimiert, während 4.2 vor allem in der Lunge und in der fetalen Muskulatur vorkommt.

1.3.4 Regulation der CytOx

Ein wichtiger Regulator für die oxidative Phosphorylierung ist die Aktivität der CytOx. Die CytOx ist das terminale Enzym der Atmungskette und begrenzt die Umsatzrate der Electron Transmission Chain (ETC). Die CytOx wird durch verschiedene Mechanismen reguliert. Die Regulation erfolgt durch die Expression der kodierten Untereinheiten, Phosphorylierungen, andere posttranslationale Modifizierungen sowie durch

Signalmoleküle (Horvat et al., 2006, Little et al., 2018, Helling et al., 2012). Die CytOx besteht aus Untereinheiten, wobei einige verschiedene Isoformen besitzen. Da bisher bei keinem weiteren Enzym der oxidativen Phosphorylierung eine weitreichende Bedeutung der Isoformen derart beschrieben wurde, wonach ein Switch der Isoformen eine Regulation bewirkt, liegt es nahe, dass die CytOx eine zentrale Rolle in der Regulation des Energiehaushaltes einnimmt. Die verschiedenen Isoformen bewirken eine Anpassung der Enzymaktivität an spezifische Anforderungen für ein Gewebe, eine allosterische Regulation bei unterschiedlichen Energieanforderungen und eine Veränderung der H^+/e^- Stöchiometrie. Außerdem spielen CytOx-Dimer-Stabilisierung und unterschiedliche Superkomplex-Formationen eine wichtige Rolle in der Regulation (Sinkler et al., 2017). Die CytOx passt sich dem Energiemetabolismus der Zelle an. Sie wird allosterisch durch ATP inhibiert, da ATP an die Matrixdomäne der Untereinheit IV bindet und die CytOx so bei ausreichender ATP Verfügbarkeit herabreguliert wird (Arnold und Kadenbach, 1997). Die Michaelis-Menten-Konstante von Cytochrom c ist in Anwesenheit von ATP fünffach höher (Napiwotzki und Kadenbach, 1998, Horvat et al., 2006). Es existierten verschiedene Phosphorylierungsstellen, die eine allosterische Regulation der CytOx bewirken können (Helling et al., 2012). Laut Prabu et al. wird die CytOx bei Hypoxie herabreguliert. Dies bewirkt eine Induktion der Proteinkinase A, welche durch Phosphorylierung der CytOx in einer verminderten Aktivität derselben resultiert. Damit einhergehend kommt es zu einer vermehrten mitochondrialen Dysfunktion und einem Anstieg der ROS Produktion (Prabu et al., 2006). Die CytOx kann durch Infrarotlichtbestrahlung reguliert werden. Dabei fungieren die Cu-Zentren als Photoakzeptoren. Eine physikalische Einwirkung von Infrarotlicht bewirkt eine Enzyminduktion (Mason et al., 2014).

1.3.5 CytOx 4-Isoformenswitch

Die ubiquitär vorkommende Isoform 4.1 wird vermehrt bei hohen ATP/ADP Quotienten exprimiert und weist durch allosterische Inhibition in Anwesenheit von ATP deutlich niedrigere Umsatzraten auf (Kadenbach und Hüttemann, 2015). Die Isoform 4.2 bewirkt einen Verlust der allosterischen Inhibition durch ATP. Ein Verlust der allosterischen Inhibition bei Normoxie in Neuronen verursacht eine Vulnerabilität der Zellen. Bei erhöhtem Energiebedarf wird die Aktivität der CytOx gesteigert und durch ein erhöhtes Membranpotential werden vermehrt ROS produziert (Horvat et al., 2006). Diese vermehrte ROS Produktion bei zellulärem Stress hat eine zellschädigende Wirkung sobald die

antioxidativen Mechanismen nicht mehr ausreichen, um die ROS zu neutralisieren (Vogt et al., 2016). Während hypoxischer Zustände ist weniger ATP verfügbar und es kommt zu veränderten Stoffwechsellagen. Die Regulation in Abwesenheit von Sauerstoff ist ein wichtiger Mechanismus der Untereinheit 4 der CytOx. In Hefen wird bei niedrigen Sauerstoffkonzentrationen vermehrt die Untereinheit Vb (Äquivalent zu Untereinheit 4.2 beim Menschen) exprimiert und führt zu Umsatzsteigerung des Enzyms. Im Tiermodell zeigte sich der Anteil an Untereinheit 4.2 in der CytOx in kortikalen Astrozyten und Körnerzellen des Kleinhirns bei hypoxischen Bedingungen deutlich erhöht (Horvat et al., 2006). Die hypoxieabhängige Regulation der Isoformen ist nur bei Säugetieren zu finden (Sinkler et al., 2017, Kocha et al., 2015). Es existieren verschiedene Theorien über die Regulationsmechanismen auf transkriptioneller Ebene. Hüttemann et al. konstatieren, dass die Regulation über einen konservierten Abschnitt im Promotor des Gens für die Untereinheit 4 der CytOx stattfindet. Dort befindet sich ein 13 bp Oxygen Responsive Element (ORE), welches mit verschiedenen Transkriptionsfaktoren interagiert. Während RBPJ und MNRR1 die Transkription aktivieren, wird diese durch CXXC5 supprimiert. MNRR1 besitzt selbst ein ORE. Die maximale Aktivität des ORE zeigte sich bei 4% Sauerstoffgehalt und führte zu einer Induktion der Isoform 4.2 der CytOx (Aras et al., 2013). Eine weitere Theorie über die Regulation wird von Fukuda et al. beschrieben. Hypoxia inducible factor 1- α (HIF-1 α) akkumuliert bei niedrigem Sauerstoffniveau. HIF-1 α induziert durch Bindung an zwei Hypoxia Responsive Elements (HREs) die Expression der mitochondrialen Protease LON, welche eine Degradierung von CytOx 4.1 bewirkt. Außerdem induziert HIF-1 α die Expression des Gens für die CytOx 4.2 (Fukuda et al., 2007, Semenza, 2011). Ob eine so niedrige Sauerstoffkonzentration physiologische Relevanz hat, ist jedoch nicht abschließend geklärt (Sinkler et al., 2017). Außerdem gibt es einige Kontroversen über diesen Signalweg, da Hwang et al konstatieren, dass HIF-1 α nicht in die Regulation der Untereinheit 4 der CytOx eingreift (Hwang et al., 2015, Kocha et al., 2015). Bei geringerer Sauerstoffverfügbarkeit findet ein Switch der Isoformen der Untereinheit 4 der CytOx statt. Der Elektronentransfer und die Energiegewinnung werden zweimal effektiver und die ROS-Produktion sinkt (Fukuda et al., 2007). Eine Veränderung der Stöchiometrie H^+/e^- resultiert. Es wird angenommen, dass die ATP/ADP-Sensitivität bei der CytOx 4.2 nicht mehr gegeben ist, da zwei der Cysteingruppen eine Disulfidbindung eingehen (Kocha et al., 2015), wodurch eine Konformationsänderung des Enzyms blockiert wird.

1.4 Fragestellung

In Zusammenschau der diversen bekannten metabolischen, strukturellen und elektrochemischen Veränderungen bei VHF stellt sich die Frage, welche Mechanismen vorrangig für die Initiierung und Aufrechterhaltung von VHF sind.

In Anbetracht der bereits beschriebenen mitochondrialen Dysfunktion bei VHF ist es das Ziel der vorliegenden Arbeit, zu klären, inwieweit eine Hochregulierung der Isoform 4.2 der Cytochrom-c-Oxidase ein permanentes VHF begleitet.

2. Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien

Tabelle 1: Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Dulbeccos modifiziertem Eagles-Medium (DMEM)	Gibco, Fisher Scientific (Schwerte)
Dulbeccos phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS)	Gibco, Fisher Scientific (Schwerte)
Trypsin	Biochrom (Berlin)
Quiazol Lysis Reagent	Qiagen (Hilden)
Chloroform	Sigma, Merck (Darmstadt)
100%iges Ethanol	Sigma, Merck (Darmstadt)
RWT TM -Puffer	Qiagen (Hilden)
RPE TM -Puffer	Qiagen (Hilden)
RNase-freies Wasser	Qiagen (Hilden)
iScript TM Reaction Mix	Biorad (Feldkirchen)
iScript TM Reverse Transcriptase	Biorad (Feldkirchen)
Nuklease-freies Wasser	Biorad (Feldkirchen)
TE-Puffer (aus TRIS und EDTA)	Gibco, Fisher Scientific (Schwerte)
RNA-Later	Sigma, Merck (Darmstadt)

2.1.2 Primer

Die Primer wurden kommerziell von der Firma QuantiTect bezogen. Sie wurden mit 1,1ml TE-Puffer (TRIS, EDTA; pH=8) versetzt, aliquotiert und bei -20°C aufbewahrt.

Tabelle 2: Primer (beta-Actin, HIF-1 α , VEGF-B, COX4.1, COX4.2)

Gen	Assay	Bestellnummer (Katalog)
Beta Actin	Hs_ACTB_2_SG	QT01680476
HIF-1 α	Hs_HIF1A_1_SG	QT00083664
VEGF-B	Hs_VEGFB_1_SG	QT00013783
Cox 4.1	Hs_COX4 1_1_SG	QT00065961
Cox 4.2	Hs_COX4 2_1_SG	QT00044933

VEGF ist sowohl während physiologischer als auch pathologischer Zustände ein Regulator der Angiogenese, indem es an den VEGF-Rezeptor bindet und als Transkriptionsfaktor fungiert. VEGF-B kommt in verschiedenen Zelltypen vor, unter anderem in quergestreifter Muskulatur und Endothelzellen. Im ischämischen Myokard zeigte sich ein Anstieg von VEGF-B (Li et al., 2008). Außerdem bewirkt VEGF-B einen Anstieg der Transkription antioxidativer Gene (Arjunan et al., 2018).

2.1.3 Untersuchungsmaterial

Zervixplattenepithel-Karzinom-Zellen des Menschen (HeLa S3) erworben von American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, USA

Intraoperativ entnommene Biopsien aus dem rechten Vorhof im Zuge des Anschlusses an die Herz-Lungen-Maschine bei Operationen der Herzchirurgie des Universitätsklinikums Marburg zwischen 2014 und 2018 (Ethikantrag Az.: 53/14).

2.1.4 Geräte

Tabelle 3: Geräte und Materialien

Geräte und Materialien	Hersteller
Vortexer	Heidolph (Schwabach)
Tischzentrifuge Micro Centrifuge	Roth (Karlsruhe)
Zentrifuge Centrifuge 5417R	Eppendorf (Hamburg)
Zentrifuge Megafuge 1.0R	Heraeus (Hanau)

Gefrierschrank Ultra Low (-80°C)	Sanyo, PHCBI (Hamburg)
Gefrierschrank (-20°C)	Liebherr (Biberach)
Kühlschrank (4°C)	Liebherr (Biberach)
Analysenwaage	Scaltec (Regau, Österreich)
NanoDrop Spektralphotometer	Thermo Scientific (Schwerte)
Thermocycler Primus 96 plus	Aviso (Jena)
RT-PCR Thermocycler	BioRad (Feldkirchen)
RT-PCR Detection System IQ5	BioRad (Feldkirchen)
Reinraumwerkbank mit Abzug	Nuaire (Edlington, UK)
Begasungsbrutschrank	Heraeus (Hanau)
Tissue-lyser	MP (Eschwege)
Mikroskop	Zeiss (Oberkochen)

2.1.5 Sonstige Materialien

Tabelle 4: Sonstige Materialien

Sonstige Materialien	Hersteller
96-Well PCR-Platte	Sarstedt (Nümbrecht)
Pipetten (10, 20, 200, 1000µl)	Eppendorf (Hamburg)
Pipettenspitzen (10, 200, 1000µl)	Sarstedt (Nümbrecht)
6-Loch-Platte	Sarstedt (Nümbrecht)
Pipette für Zellkultur	Glasfirn (Gießen)
Pipettenspitzen für Zellkultur	Greiner bio-one (Kremsmünster)
Kulturschale	Sarstedt (Nümbrecht)
Kulturflasche	Sarstedt (Nümbrecht)
Skalpell	Braun (Tuttlingen)
Petrischale	Sarstedt (Nümbrecht)
Reaktionsgefäß für Tissuelyser, Lysing Matrix A	MP (Eschwege)

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

2.2.1.1 Zellen

Die Experimente im Rahmen der Voruntersuchung erfolgten mit der humanen Hela-S3-Tumorzelllinie. Zunächst wurden die Zellen, welche in flüssigem Stickstoff eingefroren waren, aufgetaut. Das Auftauen erfolgte bei Raumtemperatur, in der Folge wurden die Zellen mit Medium versetzt. Anschließend mussten die Zellen mit 1000rpm bei 20°C zentrifugiert und das entstandene Pellet mit Medium resuspendiert werden. Die Zellen wurden in einer 250ml Zellkulturflasche ausplattiert und in einem Brutschrank bei 37°C, in einer mit Wasserdampf gesättigten Atmosphäre mit 5% CO₂, kultiviert. Das verwendete Medium ist das nach Dulbecco modifizierte Eagles-Medium (DMEM) mit 10% fötalem Rinderserum- (FBS) und 1% Penicillin/Streptomycin-Anteil.

Bis die Zellen konfluent waren, erfolgte ein regelmäßiger Mediumwechsel (alle 2-3 Tage). Das Wachstumsverhalten wurde mit regelmäßigen mikroskopischen Kontrollen überprüft. Bei ausreichend konfluentem Wachstum wurden die Zellen gesplittet und in 6-Loch-Platten aufgeteilt. Hierzu musste das Medium entfernt und die Zellen mit PBS (Dulbeccos phosphatgepufferte Kochsalzlösung, pH=7,4) zweimal gewaschen werden. Anschließend wurden 2 ml Trypsin in die Flaschen gegeben mit anschließender 5-6-minütiger Inkubationszeit. Die mittels Trypsins abgelösten Zellen wurden nun mit neuem Medium (DMEM) versetzt und unter mikroskopischer Kontrolle gleichmäßig auf die Vertiefungen der Platte verteilt. Ein Anteil der Zellen wurde jeweils zurück in die Kulturflasche gegeben, mit Medium versehen und im Brutschrank aufbewahrt.

Je eine 6-Loch-Platte für die Kontrolle im normalen Brutschrank (s.o.) und eine für den Hypoxie-Versuch in der Hypoxie-Kammer wurde mit den mit Medium 1:4 verdünnten Zellen versehen.

2.2.1.2 Hypoxiekammer

Die Behandlung der Hela-Zellen erfolgte mittels einer Hypoxiekammer. 12 Stunden nach der Aufteilung der Zellen auf die 6-Loch-Platten wurde der Versuchsteil der Zellen in die

Hypoxiekammer gegeben, welche einen N_2/CO_2 - Gehalt von 95%/5% aufweist, und bei 37°C inkubiert.

Nach einer Inkubationszeit von 8 Stunden erfolgte die Entfernung des Mediums. Ohne Verzögerung wurden Zellen mit 700µl Quiazol Lysis Reagens pro Vertiefung der Platte behandelt. Dies erfolgte simultan sowohl bei den Versuchszellen als auch bei den Kontrollen.

Dieser Versuch wurde nach dem Erstversuch zweimal mit identischem Versuchsablauf wiederholt.

2.2.1.3 RNA-Extraktion

Der erste Schritt der RNA-Extraktion beinhaltete die Behandlung der Zellen mit 700µl Quiazol Lysis Reagens. Alle Schritte beziehen sich auf das miRNeasy™ Mini Kit, welches für die RNA-Gewinnung genutzt wurde.

Die in 2ml Reaktionsgefäßen lysierten Zellen wurden mit 140µl Chloroform versetzt, für 15 Sekunden manuell geschüttelt und für 2-3 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nun mussten die Zellen bei 4°C bei 12.000xg für 15 Minuten zentrifugiert werden. Alle weiteren Schritte erfolgten bei Raumtemperatur.

Die obere der drei entstandenen Phasen wurde abpipettiert, in ein neues Sammelreaktionsgefäß gegeben und mit der anderthalbfachen Menge 100%igen Ethanol versetzt. Anschließend wurden 700µl jeder Probe auf eine miRNeasy Säule in einem 2ml Sammelreaktionsgefäß gegeben und bei 8000xg für 15 Sekunden zentrifugiert. Nachdem mit dem Rest der Proben das identische Prozedere erfolgte, wurden 700µl RWT™-Puffer auf alle Säulen gegeben und bei 8000xg für 15 Sekunden zentrifugiert. Mit 500µl RPE™-Puffer wurde nun der vorherige Schritt wiederholt. Mit weiteren 500µl RPE™-Puffer wurden die Proben nun bei 8000xg für zwei Minuten zentrifugiert. Die Säulen wurden in ein neues Reaktionsgefäß gesetzt und bei voller Geschwindigkeit für eine Minute zentrifugiert. Anschließend mussten die Säulen in ein neues 1,5ml Sammelreaktionsgefäß gegeben werden. Auf die Säule wurde jetzt 40µl RNase-freies Wasser gegeben und das Gefäß bei 8000xg für eine Minute zentrifugiert. Durch das Zentrifugieren erfolgte die RNA-Extraktion aus der Säule in das Reaktionsgefäß. Die RNA wurde sofort auf Eis gelagert.

2.2.1.4 RNA-Messung

Die Messung der Proben zur exakten Bestimmung des RNA-Gehaltes erfolgte mittels eines Spektralphotometers. Für die Messung wurden jeweils 2µl der Proben verwendet. Die Absorption bei den Wellenlängen 260nm/280nm, sowie bei 230nm/260nm wurden bestimmt. Die Bestimmung der Absorption schließt Verunreinigungen aus und erlaubt so eine exakte Bestimmung des RNA/µl Gehaltes pro Probe. Die fertiggestellten und gemessenen RNA-Proben wurden nun bei -80°C eingefroren oder direkt für die cDNA-Synthese genutzt.

2.2.1.5 cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese erfolgte mittels iScript™ cDNA Synthesis Kit von BioRad. Die RNA-Menge der einzelnen Proben wurde auf eine Menge von 1µg RNA pro Probe gemittelt. Hierfür wurde die Messung der RNA verwendet, um durch eine Verdünnung der RNA mit RNase freiem Wasser die gewünschte RNA Menge zu erreichen. Dadurch konnte 1µg RNA pro Probe verwendet werden. Pro Reaktionsgefäß wurden so 15µl H₂O mit RNA verwendet. Die cDNA Synthese erfolgte in 0,2ml Reaktionsgefäßen mit dem Cycler Primus 96 plus™ (Aviso, Jena, Deutschland).

Tabelle 5: Zusammensetzung der Proben pro Reaktionsgefäß

Komponente	Volumen in µl
5x iScript™ Reaction Mix	4
iScript™ Reverse Transcriptase	1
Nuklease-freies Wasser	variabel
Vorgelegte RNA	variabel
Volumen pro Reaktionsgefäß	20

Die Proben in 200µl Reaktionsgefäßen wurden nach folgendem Reaktionsprotokoll inkubiert:

Tabelle 6: Reaktionsprotokoll cDNA-Synthese

Priming	5 Minuten bei 25°C
Reverse Transcription	20 Minuten bei 46°C
RT-Inactivation	1 Minute bei 95°C
Kühlen	∞ bei 4°C, Proben wurden jedoch zeitnah aus dem Cyclor entnommen

Die fertiggestellten Proben mit der cDNA wurden nun entweder bei -22°C eingefroren oder direkt für die Realtime-PCR verwendet.

2.2.1.6 RT-PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion ist eine Reaktion, welche ermöglicht, DNA-Sequenzen mittels einer Polymerase zu vervielfachen. Spezifische gegenläufig orientierte Primer, welche 10-20 Basenpaare lang sind, lagern sich an die betreffenden Stellen der DNA an. Die Taq-Polymerase (*Thermus aquaticus*) startet an den Primern mit der Amplifikation des Genabschnittes. Benötigt werden hierzu ausreichend synthetische Oligonukleotide, die als Substrat für die Polymerase dienen. Der Vorgang der PCR besteht aus der Wiederholung eines Zyklus, welcher 3 Schritte beinhaltet: Denaturierung, Anlagern der Primer, Verlängerung des Amplifikates. Durch diese Reaktionsschritte wird die Matrize exponentiell vervielfacht. Während der Denaturierung werden bei 95°C durch Auflösung der Wasserstoffbrückenbindungen die DNA-Stränge separiert. Während der zweiten Phase erfolgt die Hybridisierung der Primer bei ~60°C mit den komplementären Abschnitten der Einzelstrang-DNA. Das Verlängern geschieht mittels einer Taq-Polymerase, welche ausgehend von den hybridisierten Primern die DNA amplifiziert. Die Polymerase ist hitzestabil, damit die Zyklen mit den zum Teil sehr hohen Temperaturen durchlaufen werden können (Garcia und Ma, 2005, Ramesh et al., 1992, Jansohn, 2012). Bei der verwendeten Realtime-PCR wird ein fluoreszenter Marker, SYBR-Green, der Reaktion zugeführt. Der Marker interkaliert mit doppelsträngiger DNA und ist somit ein Indikator für alle von der Polymerase amplifizierten Genabschnitte. Wenn der Marker mit der DNA interkaliert, kann er optisch gemessen werden. Je mehr Produkte gebildet werden, desto mehr Fluoreszenz interkaliert und kann nachgewiesen werden. Von der Menge an fluoreszierendem Marker kann direkt proportional auf die Menge des Produkts

geschlossen werden, die Methode erlaubt also eine Quantifizierung des Amplifikates (Jansohn, 2012). Mittels relativer Quantifizierung wird die Menge des zu bestimmenden Produktes mit einer Referenzsequenz (Housekeeping-Gen) mit konstanter Expression ins Verhältnis gesetzt (Jansohn, 2012). Da der fluoreszente Farbstoff an alle doppelsträngigen DNA-Moleküle bindet, können zum Beispiel Primer-Dimere das Ergebnis verfälschen. Daher ist es wichtig, nach der RT-PCR eine Schmelzkurvenanalyse durchzuführen. Werden verschiedenen Schmelzpunkte nachgewiesen, ist eine Ergebnisverfälschung durch Primer-Dimere wahrscheinlich und die Spezifität des Ergebnisses nicht mehr gegeben (Jansohn, 2012).

Die Realtime PCR wurde mit dem Multicolor Detection System der Firma BioRadTM durchgeführt.

Für die RT-PCR wurde mit die im vorherigen Schritt hergestellte cDNA als Template verwendet. Es wurden Quantitect Primer Assays für β -Actin, VEGF-B (vascular endothelial growth factor), HIF-1 α (hypoxia inducible factor), CytOx 4.1 (Cytochrom-c-Oxidase Untereinheit 4, Isoform 1) und CytOx 4.2 (Cytochrom-c-Oxidase Untereinheit 4, Isoform 2) verwendet.

Zunächst wurde die cDNA mit H₂O in einem Verhältnis von 1:5 verdünnt. Anschließend wurden je 2 μ l verdünnter cDNA pro Vertiefung in eine 96-Loch-Platte vorgelegt. Weiterhin wurde jeweils ein Master-Mix für jedes Primerpaar hergestellt, von welchem 18 μ l pro Vertiefung zur vorgelegten cDNA hinzugefügt wurde.

Tabelle 7: Zusammensetzung pro Vertiefung der Platte

Komponente	Volumen in μ l
Verdünnte cDNA	2
H ₂ O	6
SSO (Sequenzspezifische Oligonukleotide)	10
Primer	2
Volumen pro Vertiefung	20

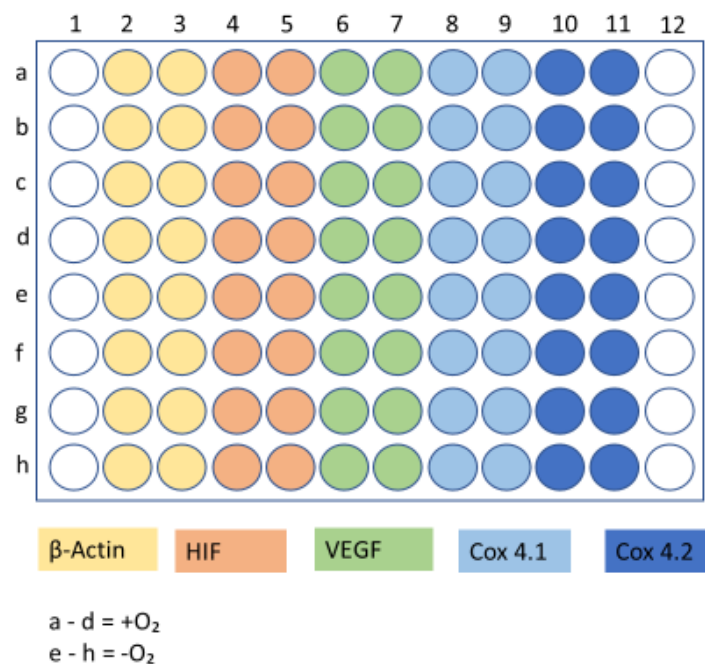


Abbildung 3: PCR-Platte, in den Zeilen a-d wurde die cDNA der Kontrollproben vorgelegt, in den Zeilen e-h die cDNA der Proben aus der Hypoxiekammer. Die Spalten 1 und 12 wurden leer belassen. Dazwischen erfolgten jeweils Doppelbestimmungen der Primer für β -Actin (Zeile 2,3), HIF-1 α (Zeile 4,5), VEGF-B (Zeile 6,7), COX 4.1 (Zeile 8,9) und COX4.2 (Zeile 10,11).

Die RT-PCR wurde mit folgendem Reaktionsprotokoll durchgeführt:

Tabelle 8: RT-PCR, Reaktionsprotokoll 1

Schritt	Länge	Temperatur
Aktivierungsschritt	15 Minuten	95°C

Anschließend 40 Zyklen:

Tabelle 9: RT-PCR, Reaktionsprotokoll 2

Schritt	Länge	Temperatur
Denaturierung	15 Sekunden	94°C
Anlagern	30 Sekunden	60°C
Verlängern	300 Sekunden	30°C

Abschließend wurde eine Schmelzkurve aller Proben angefertigt. Die Schmelzkurven zeigen, ob ein spezifisches Produkt amplifiziert und nachgewiesen wurde. Verunreinigungen

oder Primer-Dimer-Bildung lassen sich durch mindestens einen zweiten Peak nachweisen und die Ergebnisse sind dementsprechend auszuschließen.

2.2.2 Vorhofgewebe

2.2.2.1 Patienten

Die in die Versuchsreihe eingeschlossenen Patienten wurden präoperativ anhand eines Aufklärungsbogens über die geplanten Untersuchungen und das Procedere aufgeklärt. Sie wurden sowohl über die Entnahme der Proben als auch die Datenerhebung, welche für die Beteiligung an der Studie benötigt wird, informiert. Die für die Arbeit benötigten Biopsien sind im Zuge des Anschlusses an die Herz-Lungen-Maschine entnommene Gewebeproben des rechten Vorhofs. Ebenfalls wurde die Einwilligung für die anonymisierte Verwendung der Krankengeschichte und Patientendaten unter der Einhaltung von Datenschutzbestimmungen gegeben. Die Studie wurde anhand eines Antrags der lokalen Ethikkommission vorgelegt, welche die Studie unter der Registriernummer Az.: 53/14 genehmigte.

2.2.2.2 Probenentnahme

Die Gewebeproben wurden während des Anschlusses des Patienten an die Herz-Lungen-Maschine entnommen. Da der rechte Vorhof kanüliert und dabei ein wenig Herzgewebe verworfen werden muss, konnten diese Gewebestücke direkt verwendet werden. Die intraoperativ entnommenen Proben mussten umgehend in ein Probenröhrchen mit 3-5ml RNA-Later-Lösung gegeben und dadurch fixiert werden. Ohne zeitlichen Verzug erfolgte die Unterteilung in 3-4 Kryo-Reaktionsgefäße (Lagerung bei -80°C).

2.2.2.3 RNA-Extraktion

Analog zu den Versuchen mit der Zellkultur musste zunächst die RNA extrahiert werden. Hierfür wurden jeweils 6 Proben langsam auf Eis aufgetaut. Mithilfe eines Skalpells wurden die Proben in Petrischalen grob zerkleinert. Makroskopisch gut sichtbares Fett- und Bindegewebe wurden entfernt und verworfen, um vorwiegend kardiales Muskelgewebe zu verwenden. Das Gewebe wurde mit jeweils 700µl Quiazol Lysis Reagent in Lysing

Matrix A-Tubes, welche mit einem Keramikkügelchen (Durchmesser 6,5mm) und einer RNase und DNase freien Zerkleinerungsmatrix versehen sind, gegeben. Während des gesamten RNA-Extraktionsverfahrens wurden die Proben weiterhin auf Eis gekühlt. Zur Lyse des Gewebes wurden die mit Lyse Reagenz und Proben versehenen Reaktionsgefäße in den Tissue-Lyser der Firma MP-Biomedicals™ gegeben. Nun wurde die Gewebeproben nach folgendem Protokoll lysiert:

Tabelle 10: Lyseprotokoll

Zeit	60 Sekunden	5 Minuten	60 Sekunden
Schritt	Lysieren bei 6m/s	Ruhen auf Eis	Lysieren bei 6m/s

Anschließend wurden die Proben 2-3 Minuten bei Raumtemperatur belassen. Um die Zerkleinerungsmatrix in dem Reaktionsgefäß zu extrahieren, wurde nun bei maximaler Geschwindigkeit für eine Minute zentrifugiert (Centrifuge 5417R von Eppendorf™, 20000xg, Hamburg, Deutschland). Nachfolgend musste die obere, flüssige Phase abpipettiert und in ein neues Reaktionsgefäß gegeben werden. Pro Probe wurden 140µl Chloroform hinzugefügt und die Proben manuell geschüttelt. Alle weiteren Schritte erfolgten identisch zur RNA-Gewinnung aus den Zellen (s.o.).

2.2.2.4 cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese erfolgte nahezu identisch zu dem Vorgang mit der zellulären RNA auch mit dem iScript™ Synthesis Kit. Der einzige Unterschied bestand darin, dass nur 200ng RNA pro Probe eingesetzt wurden. Auch in diesem Fall wurde das Reaktionsprotokoll analog verwendet.

2.2.2.5 RT-PCR

Der Ablauf der RT-PCR entsprach dem Ablauf der Versuche, wie mit den aus der Kultur gewonnenen Zellen. Die anfängliche Verdünnung der cDNA wurde in einem Verhältnis von 1:3 durchgeführt. Die Zusammensetzung der Proben, sowie das Reaktionsprotokoll waren identisch.

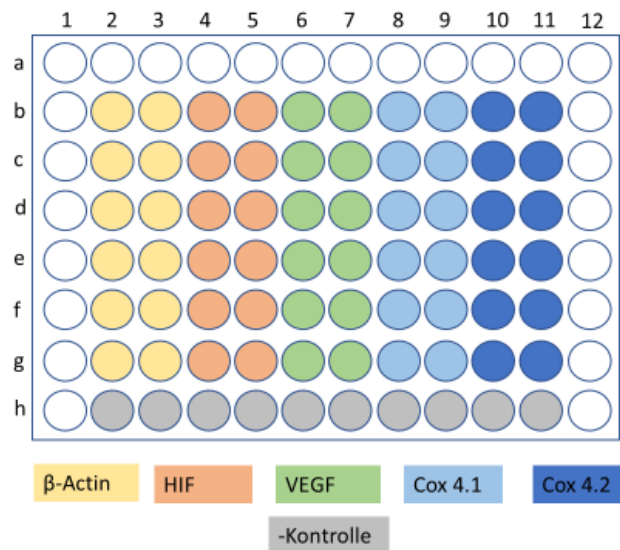


Abbildung 4: PCR-Platte, in den Zeilen b-g wurde die cDNA aus dem Myokard von 6 Patienten vorgelegt. Die Spalten 1 und 12 wurden leer belassen. Dazwischen erfolgten jeweils Doppelbestimmungen der Primer für β -Actin (Zeile 2,3), HIF-1 α (Zeile 4,5), VEGF-B (Zeile 6,7), COX 4.1 (Zeile 8,9) und COX4.2 (Zeile 10,11). In Zeile 12 erfolgte eine Negativkontrolle mit RNase freiem Wasser.

2.2.3 Statistik

Für die Auswertung der Ergebnisse der RT-PCR wurde, entsprechend den zu untersuchenden Genabschnitten, ein Referenzgen, das sogenannte „Housekeeping Gen“, bestimmt. Unter Bezugnahme auf das Referenzgen (Normalisierung), kommt es zu einer Varianzminderung der Ergebnisse. Ebenfalls erfolgten Doppelbestimmungen. Zur weiteren Analyse der Ergebnisse, wurde die $\Delta\Delta\text{ct}$ -Methode angewandt. Bei dieser Methode wurde zunächst das ΔCT beider PCR-Werte eines zu messenden Gens mit den zwei Werten des Referenzgens (β -Actin) dieser Probe bestimmt. Die ΔCT -Werte aller Proben wurden nun gemittelt. Die Differenzen zwischen diesem Mittelwert aller Proben und jedem der vier ermittelten ΔCT -Werte wurden bestimmt, und so der $\Delta\Delta\text{CT}$ -Wert bestimmt. Nun wurden diese berechneten Differenzen in folgende Formel eingesetzt, um die Abweichung zu berechnen: $f(x)=x^{2*(-\Delta\Delta\text{CT})}$ (Fleige et al., 2006).

Die Ergebnisse dieser Einzelwerte können anschließend aufeinander bezogen werden, da sowohl die einzelnen Gene anhand des Referenzgens normalisiert wurden und die Ergebnisse auf den Mittelwert aller ΔCT -Werte bezogen sind. Es handelt sich daher um die relativen Expressionen der untersuchten Gene.

Die statistische Analyse der relativen Genexpressionen wurde mittels Sigma StatTM und Sigma PlotTM durchgeführt. Aufgrund der nicht normalverteilten Werte (Kolmogorov–Smirnov–Test), scheiterte der zum t-Test gehörige Equal Variance Test. Alternativ wurde der Mann-Whitney Rank Sum TestTM angewandt, welcher aussagt, ob die Werte der verglichenen Gruppen zufällig angeordnet sein können oder ob es einen statistisch signifikanten Unterschied gibt. Bei einem p-Wert von $<0,05$ wird das Ergebnis als signifikant angesehen.

Zur Auswertung der Patientencharakteristika wurde zur Bestimmung der Signifikanzen bei binären Variablen der Fisher's Exact TestTM angewendet. Angaben wie Alter, BMI und echokardiographische Parameter wurden mittels t-Test oder bei nicht normalverteilten Werten mittels Mann-Whitney Rank Sum TestTM auf Signifikanzen untersucht.

3. Ergebnisse

3.1 Klinische Patientencharakteristika

Es wurden von insgesamt 42 Patienten Gewebeproben aus dem rechten Vorhof im Zuge von herzchirurgischen Operationen entnommen (n=31 mit Sinusrhythmus, n=11 mit VHF). Die klinischen Charakteristika des Patientenkollektivs sind in Tabelle 11 zusammengefasst worden. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede im Vergleich von Untersuchungs- und Kontroll-Gruppe in Bezug auf Alter, BMI und den meisten echokardiographischen Parametern. Unterschiede zeigten sich in Bezug auf linksatriale endsystolische Durchmesser und dem Anteil der Klappenoperation. Alle Patienten mit einer Vorgeschichte von **paroxysmalem** VHF wurden aus dem Kollektiv ausgeschlossen. Ebenfalls wurden Patienten mit einem deutlich erhöhten präoperativen CRP (>100mg/dl) ausgeschlossen, da inflammatorische Signalwege durch TNF- α in den zellulären Energiehaushalt eingreifen und die Ergebnisse verfälschen könnten (Chua et al., 2016, Kim et al., 2017a, Abe et al., 2017).

Tabelle 11: Klinische Patientencharakteristika

Charakteristikum	SR (n=23)	VHF (n=10)	p-Wert
Alter, Jahre	69,3+/-2,3	70,4+/-2,6	p=1,0 n.s.
Geschlecht (männlich), % (n)	73,91 (17)	70,00 (7)	p=1,0 n.s.
Komorbiditäten, % (n)			
Diabetes	43 (10)	30 (3)	p=0,7 n.s.
Hypertonie	100 (23)	100 (10)	p=1,0 n.s.
Hyperlipidämie	87 (20)	60 (6)	p=0,2 n.s.
Nikotinabusus	35 (7)	12,5 (1)	p=0,34 n.s.
Chron. Niereninsuffizienz	8,7 (2)	10 (1)	p=1,0 n.s.
Koronare Herzkrankheit	96 (22)	80 (8)	p=0,21 n.s.
Herzinsuffizienz	26 (6)	50 (5)	p=0,24 n.s.

Chron. Obstruktive Lungenerkrankung	8,7 (2)	20 (2)	p=0,56 n.s.
Herzklappenerkrankung	74 (17)	90 (9)	p=0,4 n.s.
Body Mass Index, kg/m ²	29+/-1,1	28+/-1,9	p=0,98 n.s.
Echokardiographie			
Linksventrikuläre Ejektionsfraktion, %	55+/-2,3	51+/-4,5	p=0,45 n.s.
Linksventrikulärer enddiastolischer Durchmesser, mm	50+/-1,8	52+/-3,7	p=0,42 n.s.
Intraventrikuläres Septum, mm	12,3+/-0,5	13+/-1	p=0,5 n.s.
Linksatrialer endsystolischer Durchmesser, mm	39,3+/-1,3	45,7+/-1,8	p<0,05
Medikation, % (n)			
β-Blocker	65 (15)	89 (8)	p=0,68 n.s.
Calciumkanalblocker	30 (7)	33 (3)	p=1,0 n.s.
ACE-Hemmer (Angiotensin-Convert- ing-Enzyme)	77 (17)	56 (5)	p=0,38 n.s.
Diuretika	52 (12)	67 (6)	p=0,69 n.s.
Statine	61 (14)	56 (5)	p=1,0 n.s.
Insulin	30 (7)	22 (2)	p=1,0 n.s.
Orale Antidiabetika	22 (5)	11 (1)	p=0,65 n.s.
Art des herzchirurgischen Eingriffes, % (n)			
Koronararterien-Bypass	61 (14)	20 (2)	p=0,06 n.s.
Bypass und Herzklappenoperation	30 (7)	10 (1)	p=0,38 n.s.
Herzklappenoperation	9 (2)	70 (7)	p<0,001

3.2 Zellkultur

Für den Nachweis, inwieweit HIF-1 α und VEGF-B durch eine Hypoxie induziert werden und diese mit der Expression von CytOx4, Isoform 1 und Isoform 2 korrelieren, wurde in der Hypoxiekammer ein Versuch mit HeLa-Zellen unter kontrollierten Bedingungen (95% Stickstoff, 5% Kohlendioxid, 37°C, 8 Stunden Dauer) durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass die mRNA Expression für HIF-1 α nach einer 8-stündigen Hypoxiebehandlung geringer ist ($p=0,003$). Außerdem zeigt sich ein Anstieg der Expression von CytOx4, Isoform 2 bei Hypoxiebehandlung ($p=0,037$) (Abbildung 5).

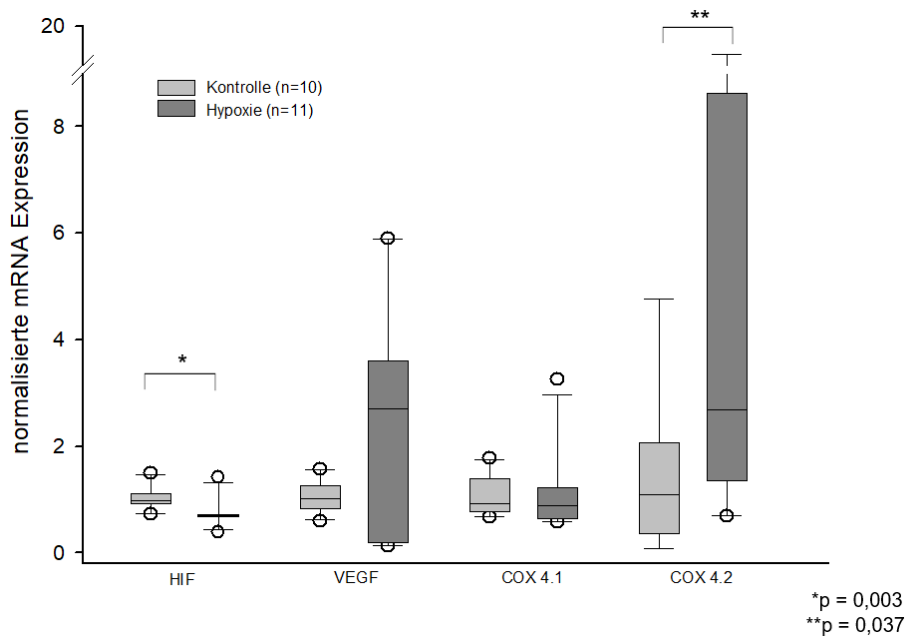


Abbildung 5: Die normalisierten mRNA-Expressionen von HIF-1 α , VEGF-B, CytOx4, Isoform1, und CytOx4, Isoform 2, der Zellkultur bei Raumluft ($n=10$) und der mit 8-stündiger Hypoxiebehandlung ($n=11$) wurden gegenübergestellt. Signifikanz der Expression von HIF ($p=0,003$) und der Expression von CytOx4, Isoform 2, ($p=0,037$) nach Mann-Whitney-U-TestTM. (VEGF: $p=0,307$, 4.1 $p=0,504$)

3.3 Nachweis von mRNA von HIF-1 α , VEGF-B, CytOx-4.1, -4.2 in intraoperativ gewonnenen Biopsien des rechten Vorhofes

Zur Beurteilung der Akutizität einer Gewebehypoxie unter den Bedingungen einer Zellkultur wurde die mRNA der Signalproteine HIF-1 α und VEGF-B bestimmt. Die Expressionen von HIF-1 α und VEGF-B in den Patientengruppen mit Sinusrhythmus und mit VHF wiesen keine signifikanten Unterschiede auf (Abbildung 6).

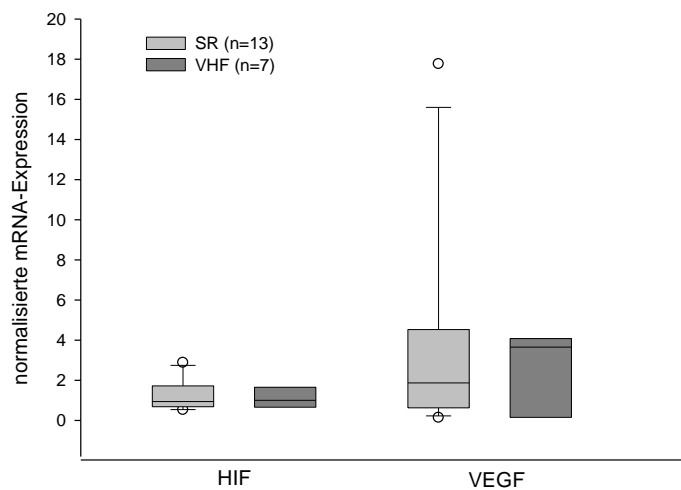


Abbildung 6: Die normalisierten mRNA-Expressionen von HIF-1 α und VEGF-B der Patientengruppe mit Sinusrhythmus (n=13) und der mit VHF (n=7) wurden gegenübergestellt. Ausgeschlossen wurden Patienten mit Diabetes mellitus. Keine Signifikanz nach Mann-Whitney-U-TestTM. (HIF p=0,874, VEGF p=0,874)

Ebenfalls wurden die Expressionen von HIF-1 α und VEGF-B in den Patientengruppen mit 0-1-Gefäß-KHK und 2-3-Gefäß-KHK gegenübergestellt. Patienten mit Diabetes mellitus wurden auch hierbei ausgeschlossen. Dabei wurden keine Unterschiede festgestellt (Abbildung 7).

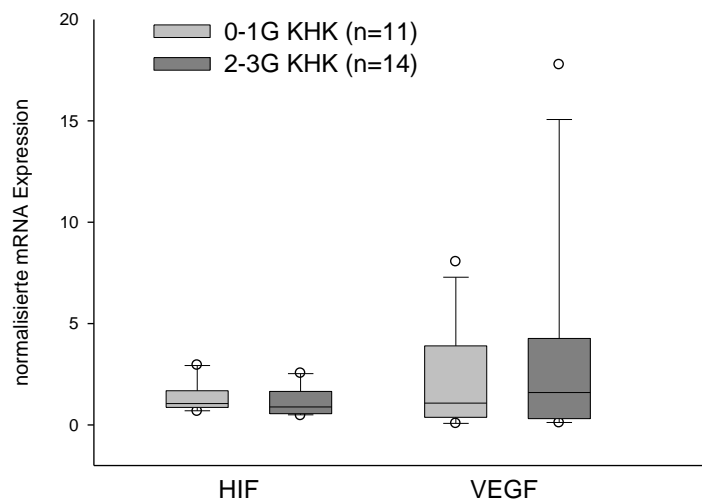


Abbildung 7: Die normalisierten mRNA-Expressionen von HIF-1 α und VEGF-B der Patientengruppe mit 0-1-Gefäß-KHK (n=11) und der mit 2-3-Gefäß-KHK (n=14) wurden gegenübergestellt. Ausgeschlossen wurden Patienten mit Diabetes mellitus. Keine Signifikanz nach Mann-Whitney-U-TestTM. (HIF p=0,180, VEGF= 0,763)

In den weiteren Untersuchungen wurden keine Unterschiede in den Expressionen von HIF-1 α und VEGF-B der Patientengruppe mit Sinusrhythmus und der mit VHF unter **Ausschluss** von Diabetikern und Patienten mit höhergradiger KHK gefunden (Abbildung 8).

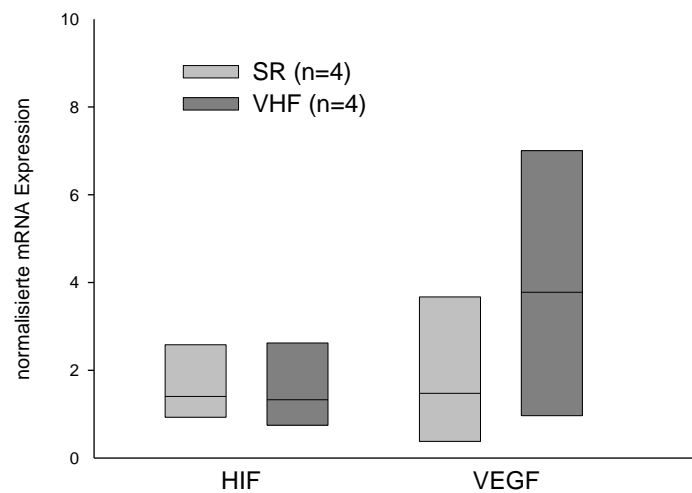


Abbildung 8: Die normalisierten mRNA-Expressionen von HIF-1 α und VEGF-B der Patientengruppe mit Sinusrhythmus (n=4) und der mit VHF (n=4) wurden gegenübergestellt. Ausgeschlossen wurden Patienten mit Diabetes mellitus und Patienten mit einer 2- oder 3-Gefäß-KHK. Keine Signifikanz nach Mann-Whitney-U-TestTM. (HIF p=0,921, VEGF p=0,306)

Durch die Expertisen der Arbeiten von Manalo et al. und Forsythe et al. (Manalo et al., 2005, Forsythe et al., 1996), die als unmittelbare Antwort des Zellgewebes auf eine Hypoxie eine deutliche Expression von HIF-1 α mit nachfolgender VEGF Hochregulierung gefunden haben, wurde ein VEGF/HIF Quotient zur Detektion einer Hypoxie verwendet. Unter der Annahme, dass VEGF/HIF Werte von <1 eine akute Hypoxie und VEGF/HIF Werte von >1 eine chronische Hypoxie anzeigen, erfolgte ein Vergleich der Expression der CytOx Isoformen. Es zeigten sich keine Unterschiede (Abbildung 9).

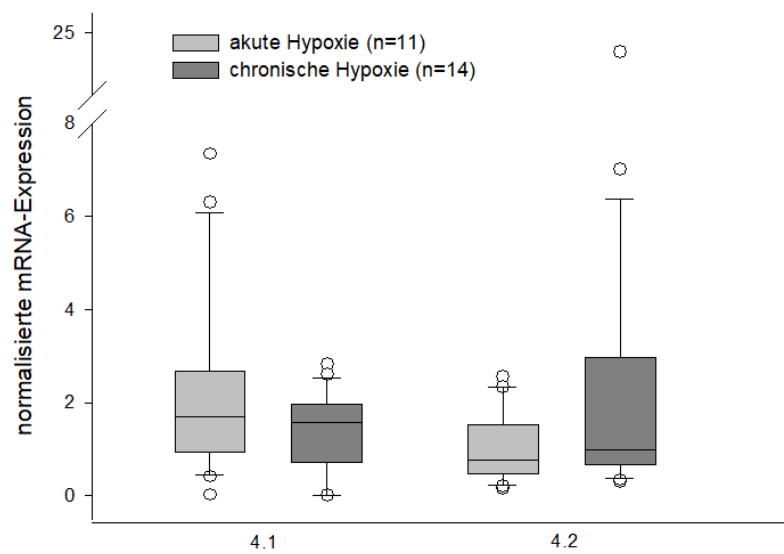


Abbildung 9: Die normalisierten mRNA-Expressionen von CytOx 4, Isoform 1, und CytOx 4, Isoform 2, der Patientengruppe mit akuter Hypoxie (VEGF/HIF<1) (n=11) und der mit chronischer Hypoxie (VEGF/HIF>1) (n=14) wurden gegenübergestellt. Keine Signifikanz nach Mann-Whitney-U-TestTM. (Cox4.1 p=0,978, Cox4.2 p=0,119)

Vergleicht man jedoch die Expressionen der CytOx 4 Isoformen zwischen den Patientengruppen mit VHF und mit Sinusrhythmus, dann ergaben sich Unterschiede im Vergleich der Isoformen zueinander. Der Quotient der Isoform 4.2 mit der Isoform 4.1 verdeutlichte die Unterschiede (unter Ausschluss der Patienten mit Diabetes mellitus) (Abbildung 10).

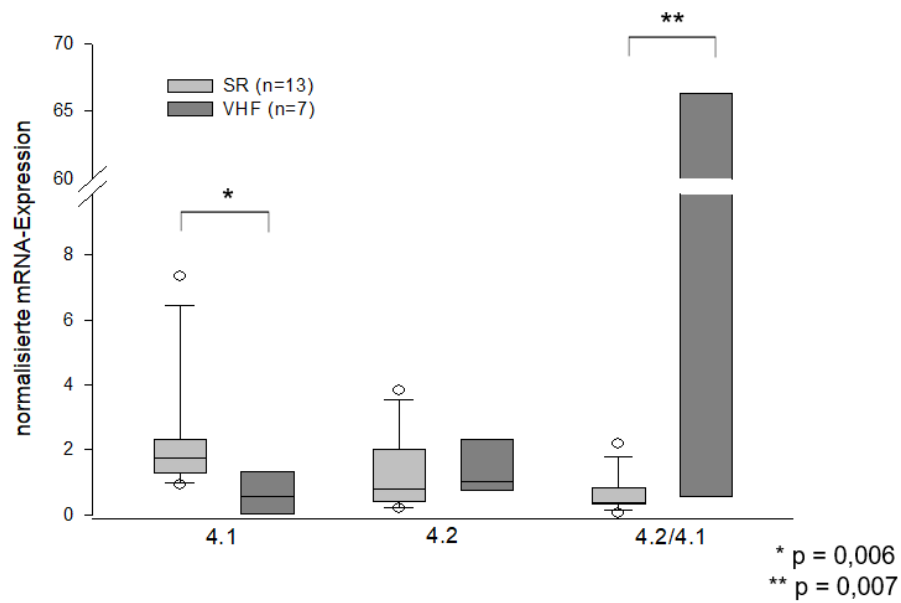


Abbildung 10: Die normalisierten mRNA-Expressionen von CytOx 4, Isoform 1, und CytOx 4, Isoform 2, sowie den Quotienten der beiden Isoformen der Patientengruppe mit Sinusrhythmus (n=13) und der mit VHF (n=7) wurden gegenübergestellt. Ausgeschlossen wurden Patienten mit Diabetes mellitus. Nach Mann-Whitney-U-TestTM signifikante Unterschiede der CytOx 4.1 Expression (p=0,006) und des Quotienten 4.2/4.1 (p=0,007). (Cox4.2 p=0,267)

Die Expressionen von CytOx 4 Isoform 1 und 2 in der Patientengruppe mit 0-1-Gefäß-KHK der mit 2-3-Gefäß-KHK gegenübergestellt. Patienten mit **Diabetes mellitus** wurden ausgeschlossen. Diese Auswertung zeigte keine Unterschiede (Abbildung 11).

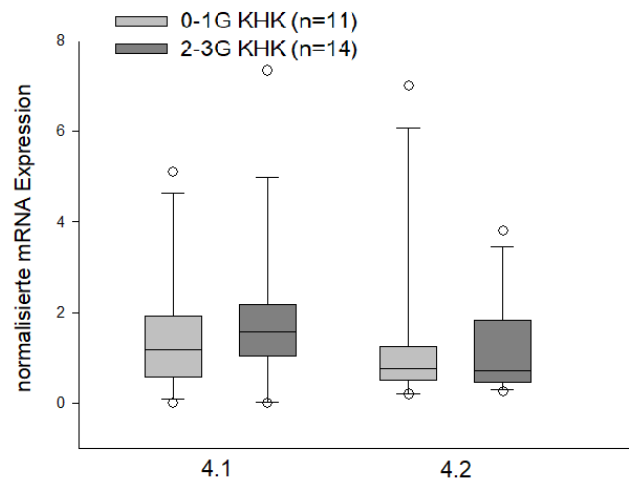


Abbildung 11: Die normalisierten mRNA-Expressionen von CytOx 4, Isoform 1, und CytOx 4, Isoform 2, der Patientengruppe mit 0-1-Gefäß-KHK (n=11) und der mit 2-3-Gefäß-KHK (n=14) wurden gegenübergestellt. Ausgeschlossen wurden Patienten mit Diabetes mellitus. Keine Signifikanz nach Mann-Whitney-U-TestTM. (Cox4.1 p=0,529, Cox4.2=0,978)

Es wurden die Expressionen der CytOx 4 Isoformen der Patientengruppe mit Sinusrhythmus und der mit Vorhofflimmern unter Ausschluss von Diabetikern und Patienten mit höhergradiger KHK gegenübergestellt. Es wurden keine Unterschiede festgestellt (Abbildung 12).

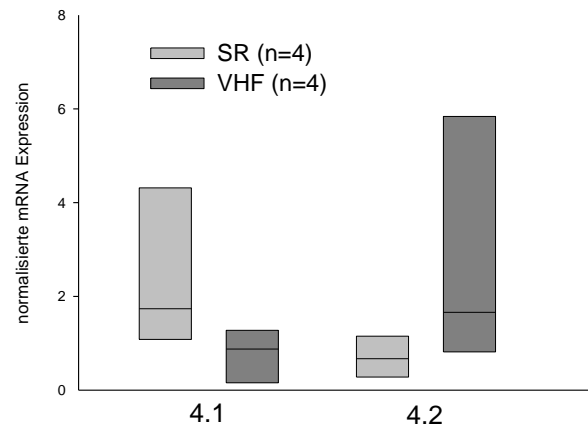


Abbildung 12: Die normalisierten mRNA-Expressionen von CytOx 4, Isoform 1, und CytOx 4, Isoform 2, der Patientengruppe mit Sinusrhythmus (n=4) und der mit VHF (n=4) wurden gegenübergestellt. Ausgeschlossen wurden Patienten mit Diabetes mellitus und Patienten mit einer 2- oder 3-Gefäß-KHK. Keine Signifikanz nach Mann-Whitney-U-TestTM. (Cox 4.1 p=0,152, Cox 4.2 p=0,209)

Es wurde sowohl bei der Patientengruppe mit Sinusrhythmus als auch bei der mit VHF eine lineare Regression der Expressionen der CytOx 4 Isoform 2 im Verhältnis zum linksatrialen enddiastolischen Durchmesser durchgeführt. Eine gegenläufige Tendenz ist sichtbar ($r_{\text{Sinusrhythmus}}=0,503$, $r_{\text{VHF}}=-0,544$), jedoch ist die statistische Auswertung durch die geringe „Power“ beeinträchtigt (Abbildung 13).

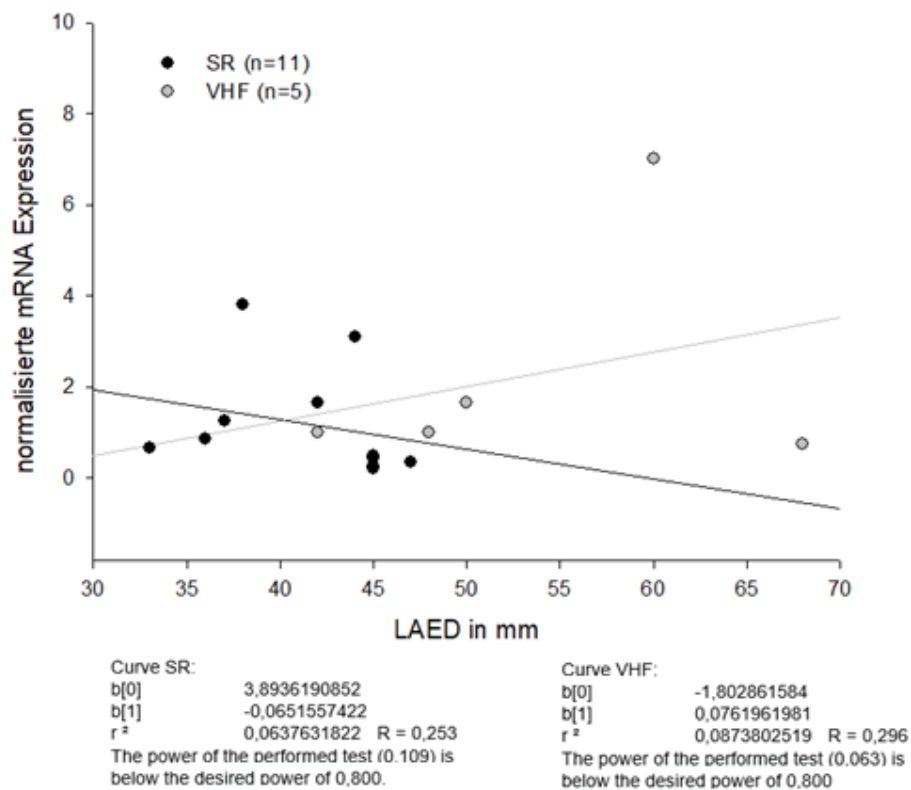


Abbildung 13: Darstellung linearer Regressionen der unterschiedlichen Subgruppen mit Sinusrhythmus und VHF. Die Expression der Isoform 2 der CytOx wurde in Abhängigkeit vom linksatrialen enddiastolischen Durchmesser aufgetragen, welcher präoperativ echokardiographisch bestimmt wurde. In der Gruppe mit Sinusrhythmus finden wir eine Korrelation von $R=0,253$ mit einer Power von 0,109. In der Gruppe mit VHF finden wir eine Korrelation von $R=0,296$ mit einer Power von 0,063.

In Bezug auf eine präoperativ angegebene Angina-Pectoris-Symptomatik (AP-Symptomatik) wurden die Expressionen von HIF-1 α , VEGF-B, CytOx4 Isoform 1 und 2 untersucht. Patienten mit Diabetes mellitus wurden ausgeschlossen. Es ergab sich eine Signifikanz für die Expression von VEGF-B (Abbildung 14).

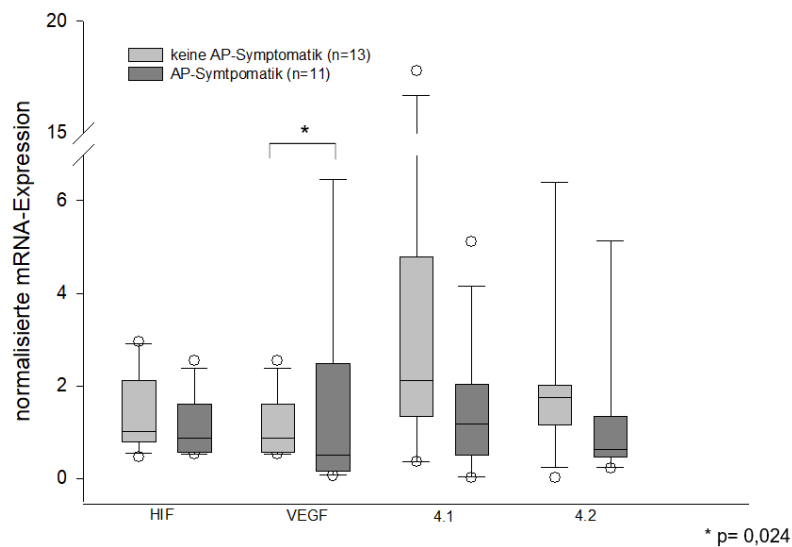


Abbildung 14: Die normalisierten mRNA-Expressionen von HIF-1 α , VEGF-B, CytOx 4, Isoform 1, und CytOx 4, Isoform 2, der Patientengruppe ohne präoperative Angina Pectoris-Symptomatik (n=13) und der mit Angina Pectoris-Symptomatik (n=11) wurden gegenübergestellt. Ausgeschlossen wurden Patienten mit Diabetes mellitus. Signifikanz der Expression von VEGF-B ($p=0,024$) nach Mann-Whitney-U-TestTM. (HIF $p=0,354$, Cox4.1 $p=0,183$, Cox4.2 $p=0,202$)

Die Subgruppe mit Statintherapie wurde mit der Kontrollgruppe ohne Statintherapie in Bezug auf die Expressionen von HIF-1 α , VEGF-B, CytOx4 Isoform 1 und 2 verglichen. Alle Patienten mit Diabetes mellitus wurden ausgeschlossen. Es ergab sich eine Tendenz für die höhere Expression der Isoform 2 der CytOx 4 (Abbildung 15).

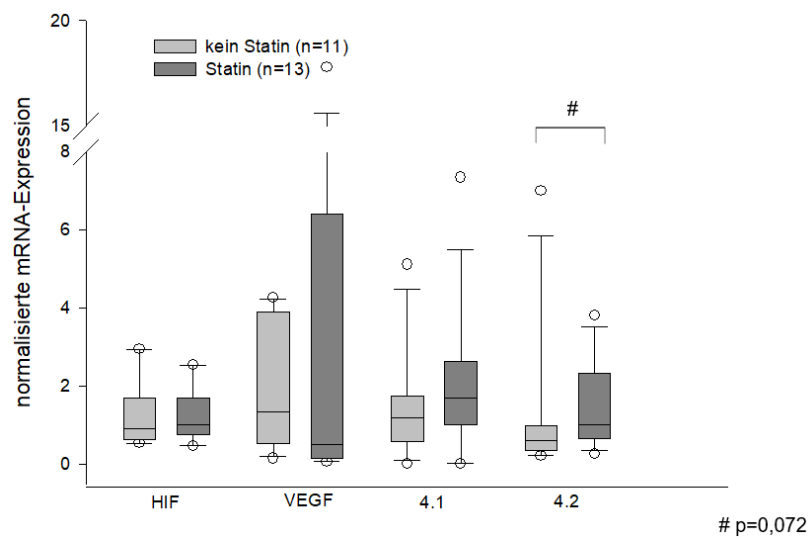


Abbildung 15: Die normalisierten mRNA-Expressionen von HIF-1 α , VEGF-B, CytOx 4, Isoform1, und CytOx 4, Isoform 2, der Patientengruppe ohne Statintherapie (n=11) und der mit Statintherapie (n=13) wurden gegenübergestellt. Ausgeschlossen wurden Patienten mit Diabetes mellitus. Keine Signifikanz nach Mann-Whitney-U-TestTM; Tendenz (#p= 0,072) der Expression von CytOx 4, Isoform 2, zu erkennen. (HIF p=0,871, VEGF p=0,772, Cox4.1 p=0,271)

Die Expressionen von HIF-1 α , VEGF-B, CytOx 4.1 und CytOx 4.2 der Patientengruppe mit Diabetes mellitus wurde den Expressionen der Patientengruppe ohne Diabetes mellitus gegenübergestellt. Dabei wurden keine Unterschiede festgestellt (Abbildung 16).

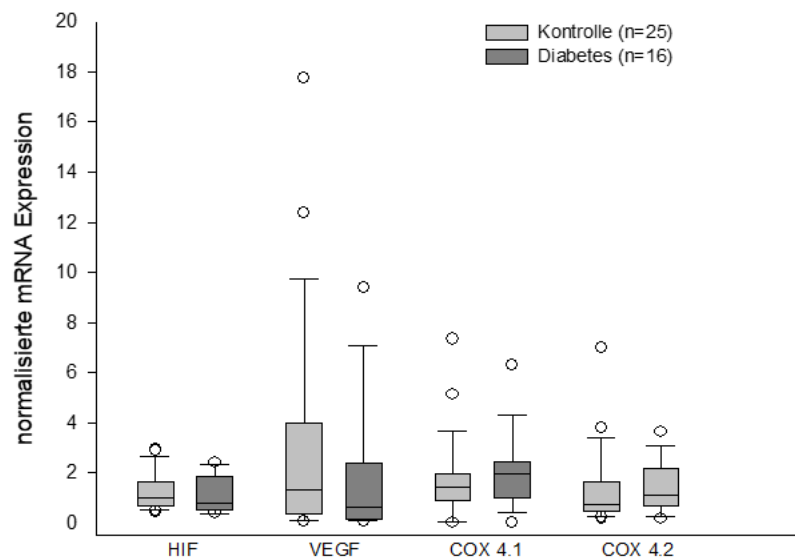


Abbildung 16: Die normalisierten mRNA-Expressionen von HIF-1 α , VEGF-B, CytOx 4, Isoform1, und CytOx 4, Isoform 2, der Patientengruppe ohne Diabetes mellitus (n=25) und der mit Diabetes mellitus (n=16) wurden gegenübergestellt. Keine Signifikanz nach Mann-Whitney-U-TestTM. (HIF p=0,329, VEGF p=0,267, Cox4.1 p=0,204, Cox4.2 p=0,329)

Von allen Patienten mit Diabetes mellitus wurden die Expressionen von HIF-1 α , VEGF-B, CytOx 4.1 und CytOx 4.2 der Gruppe mit Sinusrhythmus der mit VHF gegenübergestellt. Dabei wurden eine tendenziell erhöhte Expression der CytOx 4.1 (p=0,064) der Patienten mit VHF festgestellt (Abbildung 17).

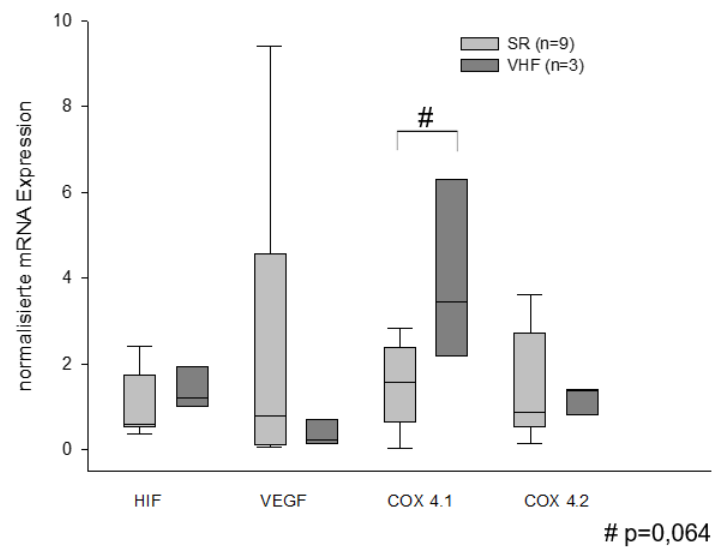


Abbildung 17: Die normalisierten mRNA-Expressionen von HIF-1 α , VEGF-B, CytOx 4, Isoform 1, und CytOx 4, Isoform 2 der Patientengruppe mit Sinusrhythmus (n=9) und der mit VHF (n=3) der Patienten mit Diabetes mellitus wurden gegenübergestellt. Nach Mann-Whitney-U-Test™ keine signifikanten Unterschiede, jedoch eine Tendenz der Expression der CytOx 4.1 (p=0,064). (HIF p=0,276, VEGF p=0,460, Cox 4.2 p=0,683)

4. Diskussion

Bei fast allen Lebewesen ist das Leben sauerstoffabhängig. Sowohl die einzelne Zelle als auch die unterschiedlichen Gewebe und Organe verfügen über Anpassungsvorgänge, um den Sauerstoffverbrauch den Belastungssituationen anzupassen. Es bestehen nicht nur Unterschiede in der Gewebeatmung, sondern auch in den Sauerstoffpartialdrücken innerhalb der Gewebe. Diese Unterschiede in den Sauerstoffkonzentrationen bedingen über transkriptionelle Vorgänge eine regulatorische Anpassung der Zellen und des Gewebes. Durch die Fähigkeit, eine Hypoxie wahrzunehmen und durch Veränderungen auf transkriptioneller Ebene darauf zu reagieren, kann das Überleben der Organismen gesichert werden. Über 300 Gene sind in die Signalwege der Sauerstoffanpassung involviert und sorgen für metabolische, regulatorische und entwicklungsspezifische Anpassungen (Eckert et al., 2019).

Die zentrale Frage bestand in der Identifizierung des Elements, welches die Hypoxie erkennt und dem Organismus entsprechende Reaktionen vermittelt. Für die Beantwortung dieser Frage erhielten Gregg Semenza, William Kaelin und Sir Peter Ratcliffe im Jahre 2019 den Nobelpreis für Medizin. Ein wichtiger Hinweis für die Beantwortung der Frage war die Beobachtung, dass Menschen, die sich in großer Höhe aufhielten, über eine erhöhte Anzahl von Erythrozyten im Blut verfügten (Bert, 1982). Im Jahr 1986 wurde die Bildung von Erythropoetin (EPO) in der Niere unter hypoxischen Bedingungen als Induktor der Erythropoese gefunden (Bondurant und Koury, 1986, Schuster et al., 1987, Jelkmann und Hellwig-Bürgel, 2001).

Der myokardiale Sauerstoffbedarf variiert unter verschiedenen Bedingungen. Während der Ruhebedarf 7-10ml/(min x 100g) beträgt, wird bei maximaler Belastung bis zu 80ml/(min x 100g) benötigt. Bei normothermem Flimmern des Myokards beträgt der Bedarf 6-8ml/(min x 100g) (Spieckermann, 1979). Laut Grover et al. zeigt sich bei flimmerndem Myokard eine erhöhte koronare Perfusion, jedoch auch ein erhöhtes Lactat und eine Zunahme der Sauerstoffverwertung des Myokards (Grover et al., 1976). Im Hinblick auf diese Erkenntnisse über die Regulation des Sauerstoffverbrauches wurde im Rahmen dieser Arbeit der Frage nachgegangen, inwieweit die oxidative Phosphorylierung unter den Bedingungen des Flimmerns beeinflusst wird.

Im EPO-Gen wurde ein 50bp Enhancer, das Hypoxia Responsive Element (HRE), nachgewiesen. Der daran bei Hypoxie bindende Transkriptionsfaktor ist der Hypoxia Inducible Factor 1 alpha (HIF-1 α). HIF ist ein Heterodimer, das aus zwei unterschiedlichen Genprodukten besteht, HIF-1 α und HIF-1 β . HIF-1 α , kodiert durch das HIF-1 α -Gen, ist ein wichtiger Regulator bei hypoxischen Bedingungen mit Auswirkungen auf Angiogenese und Energiemetabolismus von Zellen (Semenza et al., 1996, Wang et al., 1995, Iyer et al., 1998). Die vermehrte Expression von HIF-1 α durch Hypoxie oder genetische Veränderungen spielt eine zentrale Rolle in der Tumorbilogie (Semenza, 2003).

HIF-1 β (ARNT) ist das Protein des Gens Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator (ARNT). ARNT dimerisiert mit verschiedenen Transkriptionsfaktoren und zeigt keine Hypoxieabhängigkeit. Einer der mit ARNT dimerisierenden Transkriptionsfaktoren ist das zu HIF-1 α strukturähnliche endotheliale Per-Arnt-Sim Domäne Protein 1 (EPAS1) -Gen. Dieses besitzt hypoxieabhängige regulatorische Funktionen und spielt eine zentrale Rolle in der Erythropoese (Ema et al., 1997, Flamme et al., 1997, Hogenesch et al., 1997, Tian et al., 1997). Das Heterodimer aus HIF-1 α und HIF-1 β aktiviert die Transkription von Zielgenen. Die Regulation von HIF-1 α geschieht posttranslational über die Stabilität des Proteins. Durch die sauerstoffabhängige Degradierungs (ODD)-Domäne des Proteins kommt es zu einer Degradierung von HIF-1 α . Dies geschieht über den Ubiquitin-Proteasom-Signalweg. Der Ubiquitin-Proteasom-Signalweg beinhaltet die Markierung von Proteinen mittels Ubiquitin. Diese Markierung führt zu einem Transport des Proteins zu Proteasomen, welche die Proteine degradieren (Glickman und Ciechanover, 2002, Hershko, 2005). Bei Normoxie kommt es zur raschen Degradierung sowohl von HIF-1 α als auch von EPAS1. Diese Degradierung geschieht über einen komplexen Signalweg. Das Von Hippel-Lindau (VHL)-Tumor-Suppressor-Gen wurde hierbei als Ligand von Proteolyse-induzierenden Faktoren identifiziert. Es wurde gezeigt, dass VHL in die Proteolyse von HIF-1 α involviert ist und als Erkennungsmerkmal für die Ubiquitin E3 Ligase dient. Die HIF-1 α -VHL-Interaktion ist sowohl sauerstoff- als auch eisenabhängig. Eine sauerstoffabhängige 4-Hydroxylierung von zwei Prolin-Resten innerhalb der ODD-Domäne von HIF-1 α ermöglicht die Interaktion mit VHL und damit eine Degradierung. Die Sauerstoffabhängigkeit der Hydroxylierung stellte sich als der zentrale Regulierungsmechanismus für die Degradierung von HIF-1 α bei Normoxie und die Persistenz bei Hypoxie heraus. Durch die Persistenz und Akkumulierung von HIF-1 α bei Hypoxie folgt die Induktion hypoxieabhängiger Gene (siehe Abbildung 1).

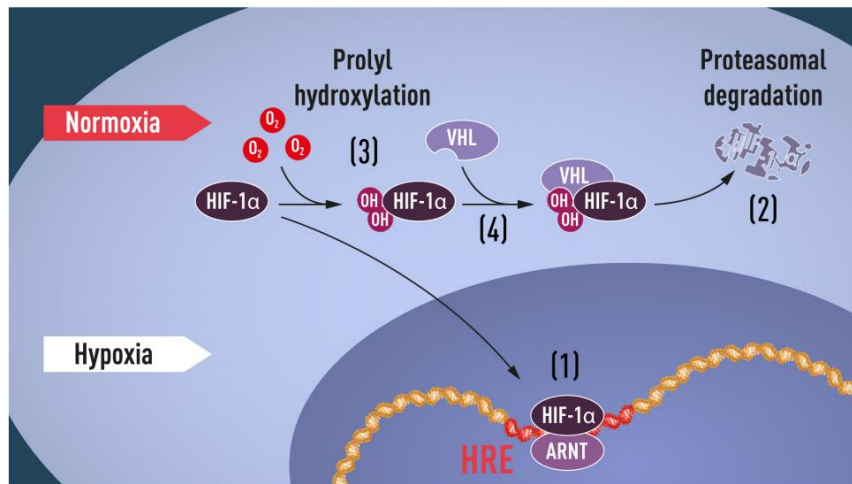


Abbildung 18: Bei Hypoxie bindet der HIF Komplex an HRE-Elemente der DNA. Dadurch kommt es zu einer Aktivierung von Genen, welche für eine Adaptierung an hypoxische Bedingungen zuständig sind (1). Bei normoxischen Bedingungen wird HIF1α durch Proteasome degradiert (2), nachdem es sauerstoffabhängig hydroxyliert wurde (3). Diese Hydroxylierung ermöglicht eine Bindung des VHL-Komplexes an das HIF-1α Protein (4) (Diese Abbildung ist aus: Eckert et al., 2019).

Eine weitere sauerstoffabhängige Regulation geschieht über den HIF-1-hemmenden Faktor 1 (FIH-1), welcher die Aktivität von HIF-1α durch eine sauerstoffabhängige Hydroxylierung inhibiert, indem es die Bindung an die DNA verhindert. Durch mehrere Regulationswege wird demnach eine exakte Regulation von HIF-1α bei unterschiedlicher Sauerstoffverfügbarkeit ermöglicht. Dadurch ergeben sich eine Vielzahl an therapeutischen Möglichkeiten für Anämien, maligne Tumore, entzündliche und kardiovaskuläre Erkrankungen, sowie Schlaganfälle und Myokardinfarkte (Pugh und Ratcliffe, 2017, Ivan und Kaelin, 2017, Semenza, 2019, Eckert et al., 2019).

4.1 Regulatorische Funktion von HIF-1α

HIF-1α ist ein Teil eines Transkriptionsfaktors, welcher die Expression von Genen reguliert, die eine Anpassung bei reduziertem zellulärem Sauerstoffangebot bewirken. Bei chronischer Hypoxie führt somit HIF-1α zu einem reduzierten mitochondrialen Metabolismus (Semenza, 2011). Während der zellulären Energiegewinnung kommt es zur Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), welche in hohen Konzentrationen zellschädigend wirken. Wenn das zelluläre Sauerstoffangebot von der Norm abweicht,

kommt es vermehrt zur Entstehung von ROS. Bei Hypoxie zeigt sich zunächst ein deutlicher ROS-Anstieg, gefolgt von einer Reduktion des ROS-Gehaltes unterhalb physiologischer Verhältnisse. Zellen von HIF-1 α -Knockout-Mäusen weisen diesen Rückgang nicht auf, sondern zeigen einen weiterhin erhöhten ROS-Gehalt bei gleichbleibender ATP-Produktion (Semenza, 2011). Demnach ist HIF-1 α essenziell für regulatorische Anpassungen des zellulären Metabolismus bei chronischer Hypoxie. HIF-1 α induziert die Expression der Pyruvat Dehydrogenase Kinase 1 (PDK1), welche die katalytische Untereinheit der Pyruvat Dehydrogenase (PDH) durch Phosphorylierung inaktiviert. Die PDH katalysiert die Reaktion von Pyruvat zu Acetyl-Coenzym-A für den Citratzyklus. Außerdem induziert HIF-1 α die Expression von B-cell lymphoma 2 (BCL2) Interacting Protein 3 (BNIP3), welches eine selektive mitochondriale Autophagie triggert. Die Induktion dieser Gene, PDK1 und BNIP3, führt zu einer verminderten ROS-Produktion bei Hypoxie. Ein weiterer Mechanismus, welcher zur Anpassung an Sauerstoffmangel führt, ist der Isoformen-Switch, der innerhalb der Untereinheit 4 des Komplexes IV der Atmungskette (Cytochrom-c-Oxidase, CytOx, EC.1.9.3.1) erfolgt. Unter aeroben Bedingungen wird die Untereinheit 4.1 der CytOx exprimiert. Bei Sauerstoffmangel kommt es zu einer vermehrten Expression der Isoform 4.2. Fukuda et al. fanden, dass HIF-1 α die Gene für CytOx 4.2 und die Protease LON induziert. Die mitochondriale Protease LON bewirkt eine Degradierung der CytOx 4.1. Der Switch erhöht die Effizienz und Enzymaktivität der Cytochrom-c-Oxidase bei hypoxischen Bedingungen. Laut Semenza et al. ist die CytOx, wenn ein Switch ausbleibt, bei einer chronischen Hypoxie als eine Quelle für ROS anzusehen (Semenza, 2011). Der Switch zur Isoform 4.2 verhindert die übermäßige Produktion zellschädigender ROS bei Hypoxie (Semenza, 2011, Fukuda et al., 2007).

4.2 VEGF

HIF-1 α induziert bei hypoxischen Zellen die Transkription von Genen, die durch Wirkung auf Endothelzellen eine Angiogenese hervorrufen. In der Kaskade der Angiogenese wird VEGF früh freigesetzt und wirkt auf Endothelzellen. VEGF führt zum Proliferieren von Gefäßen, um eine bessere Durchblutung und Sauerstoffversorgung zu gewährleisten. Das VEGF-Expressions Gen ist ein primäres Zielgen von HIF-1 α , welches neben anderen Angiogenese-stimulierenden Faktoren bei hypoxischen Zellen induziert wird. Es wurde

gezeigt, dass HIF-1 α an ein Hypoxia Responsive Element (HRE) des VEGF Gens bindet (Manalo et al., 2005, Kelly et al., 2003, Forsythe et al., 1996). Die VEGF-Familie besteht aus den VEGF-Typen A,-B,-C, -D und dem Placental Growth Factor (PlGF). Diese unterschiedlichen Signalproteine spielen eine wichtige Rolle in der Angiogenese. In dieser Arbeit konzentrierten wir uns auf VEGF-B, das seine Funktion durch die Bindung an den VEGF-Rezeptor 1 (VEGFR-1) vermittelt. Die angiogenetische Funktion von VEGF-B ist hauptsächlich im ischämischen Myokard beschrieben worden. Daher wurde es in dieser Arbeit als Parameter verwendet, um eine einsetzende Angiogenese im Sinne einer Gewebereaktion auf eine chronische Hypoxie nachzuweisen (Claesson-Welsh, 2008, Li et al., 2008). Weiterhin hat VEGF-B antioxidative Eigenschaften und kann effektiv oxidativen Stress vermindern (Arjunan et al., 2018). Die VEGF-Rezeptoren (VEGFR-1, -2, -3) werden ebenfalls durch HIF-1 α reguliert. Bei hypoxischem Stress kommt es zu selektivem Anstieg dieser Rezeptoren, induziert durch HIF-1 α . Vor allen Dingen wird VEGFR-2 in Skelett- und Herzmuskulatur sowie der Lunge exprimiert (Xie et al., 2017). HIF-1 α ist somit ein Modulator der Angiogenese mittels Hochregulierung verschiedener Gene, inklusive VEGF und VEGFRs (Zimna und Kurpisz, 2015).

4.3 CytOx Isoformen

Die Reaktion der CytOx, Komplex IV der Atmungskette, gilt als Schrittmacher für die Regulation der mitochondrialen ATP-Produktion. Die katalytische Aktivität der CytOx wird durch die Bindung von ATP an den N-Terminus der Untereinheit 4 verändert. Bei ausreichender ATP-Verfügbarkeit wird die katalytische Funktion des Enzyms durch die Bindung allosterisch inhibiert und reguliert somit den zellulären Energiehaushalt. Die Untereinheit 4 der CytOx besitzt zwei Isoformen. Die Isoform 4.1 wird ubiquitär exprimiert und durch ATP allosterisch reguliert. Die Isoform 4.2 wird bei hypoxischen Bedingungen vermehrt exprimiert und ist ATP-unabhängig. Bei Hypoxie ist die Aktivität der CytOx demnach unabhängig vom zellulären Energieangebot. Dies spricht dafür, dass die Veränderung der Isoform-Expression der CytOx eine zentrale Rolle in der Regulation der Atmungskette bei unterschiedlicher Sauerstoffverfügbarkeit einnimmt (Horvat et al., 2006).

Da das VHF mit einer funktionellen Hypoxie assoziiert ist (White et al., 1982, van Bragt et al., 2014), untersuchten wir zunächst die Expressionen von HIF-1 α und VEGF-B, da

diese, wie beschrieben, bei Hypoxie subsequent induziert und vermehrt exprimiert werden. Zunächst wird HIF-1 α vermindert degradiert und in der Folge wird VEGF, ein Zielgen von HIF-1 α , hochreguliert. Wie gezeigt werden konnte, wird als Ausdruck der Hypoxie bei VHF ebenfalls die Untereinheit 4.2 der Cytochrom-c-Oxidase vermehrt exprimiert (Vgl. Abbildung 10). Aus dem Switch von der Isoform 4.1 zur Isoform 4.2 resultiert eine veränderte Kinetik der Arbeitsweise des Enzyms CytOx. Durch die Unabhängigkeit von der Regulation durch hohe ATP/ADP Quotienten, weist die CytOx auch bei hypoxischen Bedingungen eine weniger eingeschränkte Aktivität und eine hyperbole Kinetik auf (Horvat et al., 2006). Bei hypoxischen Bedingungen kommt es somit zu oxidativem Stress, indem die Komplexe I und III vermehrt ROS produzieren (Emelyanova et al., 2016). Andererseits wird unter hypoxischen Bedingungen die Funktion der CytOx aufrechterhalten, jedoch unter vermehrter Bildung der Isoform 2 der Untereinheit 4 und einer ATP-unabhängigen Enzymkinetik, sodass eine ansteigende Enzymaktivität bei erhöhtem mitochondrialen Membranpotential mit einer gesteigerten ROS-Bildung, also oxidativem Stress, einhergeht (Horvat et al., 2006, Kadenbach et al., 2004). Demgegenüber stehen die Ergebnisse von Fukuda et al., die besagen, dass ein erhöhter Anteil der Isoform 4.2 nicht nur mit einer Effizienzsteigerung, sondern auch mit einer verminderten Produktion von ROS einhergeht (Fukuda et al., 2007). Zusätzlich zur Regulation durch den Sauerstoffgehalt im Gewebe beschreiben Helling et al. multiple Phosphorylierungen, welche die Aktivität des Enzyms CytOx ebenfalls beeinflussen (Helling et al., 2012) und im Rahmen dieser Arbeit nicht betrachtet werden konnten.

Die Existenz von Sauerstoff in der Atmosphäre ermöglicht vielen Organismen ein Überleben durch oxidative Energiegewinnung. Diese Abhängigkeit erfordert jedoch Anpassungsprozesse bei Hypoxie, bzw. bei Zuständen eines großen Sauerstoffverbrauches. Die Anpassung an Hypoxie ist ein zentraler Mechanismus der Evolutionsgeschichte. Bakterien, Hefen und Säugetiere besitzen spezifische Sensoren für Hypoxie, welche die Regulation von Stoffwechselprozessen und Genen durch jeweilige Transkriptionsfaktoren initiieren. Eine universelle Rolle in der Regulation bei Säugetieren nimmt der Transkriptionsfaktor HIF-1 α ein. HIF-1 α greift in die Regulation von Angiogenese, Erythropoese, Glykolyse, Glukosetransportern, Gefäßtonus, Synthese von Neurotransmittern und Häm-Synthese ein (Gleadle und Ratcliffe, 2005). Beispielsweise finden Regulationsvorgänge durch HIF-1 α bei niedrigen Sauerstoffpartialdrücken ebenfalls in großer Höhe statt. Laut Murray und Horscroft kommt es bei Aufenthalt in extremer Höhe zusätzlich zu einer

Reduzierung der Mitochondriendichte in den Muskeln bei Aufrechterhaltung der Leistungsfähigkeit. Dies spricht für ein mitochondriales Remodeling unter hypoxischen Bedingungen (Murray und Horscroft, 2016). Diese Regulationsprozesse der Atmung spielen demnach nicht nur bei pathologischen Zuständen eine Rolle, sondern sind offensichtlich ein prinzipieller, elementarer Bestandteil der mitochondrialen Adaptation an die Leistungsanforderungen an den Organismus und das Sauerstoffangebot der Umgebung.

Die Aktivität der Cytochrom-c-Oxidase ist der geschwindigkeitsbegrenzende Faktor der Atmungskette. Die Regulation dieses Enzyms spielt daher eine zentrale Rolle für die Energiegewinnung, d.h. für die ATP-Produktion. Das Enzym ist ein Dimer, bestehend aus zwei Monomeren mit jeweils 13 Untereinheiten. Eine besondere Bedeutung für die Atmungsregulation besitzt die Untereinheit 4 der CytOx (Horvat et al., 2006). Nach gegenwärtigen Erkenntnissen ist bei Säugetieren die Untereinheit 4 die einzige Molekülstruktur, die auf Umweltbedingungen reagiert und die somit eine wichtige regulatorische Stellung einnimmt (Sinkler et al., 2017, Napiwotzki und Kadenbach, 1998, Acin-Perez et al., 2011, Kocha et al., 2015). Es existieren zwei Isoformen der Untereinheit 4. Die ubiquitär vorkommende Isoform 4.1 wird bei hohen ATP/ADP Quotienten exprimiert und weist durch allosterische Inhibition in Anwesenheit von ATP deutlich niedrigere Umsatzraten auf (Kadenbach und Hüttemann, 2015). Der Fokus liegt in der vorliegenden Arbeit auf der Isoform 2 der Untereinheit 4. Während die ATP-Bindungsstelle der Isoform 4.1 bei allen Wirbeltieren konserviert zu sein scheint, besteht bei den Eigenschaften der Isoform 4.2 nach wie vor Uneinigkeit über die Evolution des Gens (Porplycia et al., 2017). Hüttemann et al. fanden die Isoform 4.2 erstmalig im Thunfisch (Hüttemann, 2000). Es wurde ein hoher Anteil im humanen Lungengewebe gefunden, jedoch in anderen Geweben nur zu einem geringeren Anteil (Kadenbach und Hüttemann, 2015). Phylogenetische Analysen zeigten, dass sich CytOx 4 Orthologe verschiedener Wirbeltiere ähnlicher sind als die CytOx 4 Paralogue (Isoform 4.1 und 4.2) eines Organismus. Die Isoform 4.2 scheint der ursprünglichen Untereinheit 4 der CytOx funktionell ähnlicher zu sein als die Isoform 4.1. In der frühen Evolution wurde die Isoform 4.2 kaum exprimiert, erst durch sinkenden Selektionsdruck kam es laut Little et al. zu einer Divergenz der Gene von 4.1 und 4.2 bei einigen Vertebraten (Little et al., 2010). In der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*, bei welcher die Untereinheit V der CytOx homolog zur humanen Untereinheit IV ist, wurde ein Anstieg der Untereinheit Isoform b der Untereinheit V der CytOx bei Hypoxie beschrieben. Bei Normoxie zeigte sich eine Expression der Isoform Va (Kwast

et al., 1998). Der Switch von Untereinheit Va zu Vb in Hefen resultiert in einer gesteigerten Umsatzrate der CytOx (Allen et al., 1995). Analog dazu wurde bei Eukaryoten ebenfalls eine Hypoxie-induzierte Expression der Untereinheit 4.2 beschrieben, jedoch nur bei Säugetieren und nicht bei Fischen oder Reptilien (Kocha et al., 2015, Horvat et al., 2006, Porplycia et al., 2017). Im Promoter des für die Isoform 4.2 kodierenden Gens wurden zwei Hypoxia Responsive Elements (HRE) identifiziert, welche laut Fukuda et al. für einen Anstieg der Expression bei Hypoxie verantwortlich sind. Durch Bindung von HIF-1 α an die Regionen im Promoter erfolgt die vermehrte Transkription des Gens für die Untereinheit 4.2 und der LON, einer Protease, welche die Untereinheit 4.1 degradiert. Der Elektronentransfer und die Energiegewinnung werden zweifach effektiver und die ROS-Produktion sinkt (Fukuda et al., 2007, Kocha et al., 2015). Die Hypothese der Regulation durch HIF-1 α und HREs wird jedoch kontrovers diskutiert, da Hüttemann et al. ein konserviertes Oxygen Responsive Element für den Expressionsanstieg bei Hypoxie verantwortlich machen, an welches verschiedene Transkriptionsfaktoren, unabhängig von HIF-1 α , binden (Hüttemann et al., 2007). Die Peptidsequenz der Isoform 4.2 beinhaltet bei Säugetieren zwei Cysteingruppen. Es wird angenommen, dass diese eine Disulfidbindung bilden, eine Konformationsänderung verhindern, und somit die allosterische Inhibition durch ATP, welche bei der Isoform 4.1 vorhanden ist, aufheben können (Kocha et al., 2015, Horvat et al., 2006, Porplycia et al., 2017). Laut Schiffer et al. führt ein erhöhter Anteil an der Isoform 4.2 in Skelettmuskulatur zu einem niedrigen Sauerstoffverbrauch, weniger ROS-Produktion und zu einem niedrigen Energieverbrauch in Ruhe (Resting Metabolic Rate, RMR) (Schiffer et al., 2016).

Bei Hypoxie werden Anpassungsvorgänge benötigt, um die Energiegewinnung effizienter werden zu lassen und die ROS-Produktion zu begrenzen. Der Switch von Isoform 1 zu Isoform 2 in der CytOx Untereinheit 4 resultiert nicht nur in einer Unabhängigkeit von den ATP/ADP Konzentrationen, sondern auch in einer höheren Umsatzrate des Enzyms durch Veränderung der H⁺/e⁻ Stöchiometrie und nimmt somit eine zentrale Rolle in der Anpassung bei Hypoxie ein (Fukuda et al., 2007). Ob die ROS-Produktion durch den Switch begrenzt oder verstärkt wird, befindet sich in einer kontroversen Diskussion. Laut Hüttemann et al. kommt es durch die gesteigerte Enzymkinetik zu einem Anstieg des Membranpotentials und somit zu vermehrtem oxidativen Stress (Kadenbach et al., 2004, Horvat et al., 2006). Im Gegensatz dazu kommt es laut Fukuda et al. zu einer Begrenzung

der ROS-Produktion durch die Isoform 4.2 bei hypoxischen Bedingungen (Fukuda et al., 2007).

4.4 Klinische Relevanz

Die Initiierung und Aufrechterhaltung von VHF geht mit strukturellen, elektrochemischen und metabolischen Veränderungen einher (Haverkamp, 2018). Eine Verknüpfung von mitochondrialer Dysfunktion und VHF wurde schon mehrfach gezeigt (Emelyanova et al., 2016, Montaigne et al., 2013, Brown und Moukdar, 2013). Emelyanova et al. beschreiben eine selektive Aktivitätsreduktion der Atmungskette bei VHF, welche mit einer vermehrten Entstehung von ROS einhergeht und somit zu oxidativem Stress führt (Emelyanova et al., 2016). Aus dem vermehrten oxidativen Stress kann eine Progression des VHF resultieren. Gleichzeitig zeigte sich bei bestehender dysfunktionaler mitochondrialer Atmung herzchirurgischer Patienten ein erhöhtes postoperatives Risiko, VHF zu entwickeln (Montaigne et al., 2013). Laut Takano et al. besteht eine Beeinträchtigung der Sauerstoffaufnahme und der Hämodynamik bei Herzen von Patienten mit VHF bei starker Belastung (Takano et al., 2019). Die Ursache der mitochondrialen Dysfunktion bei VHF sind möglicherweise inflammatorische Prozesse. Serumanalysen von Patienten, welche ein postoperatives VHF entwickelten, wiesen eine vermehrte Expression von Genen für inflammatorische Marker, wie Transforming Growth Factor- β (TGF- β), Tumornekrosefaktor- α -induziertes Protein 6 (TNFAIP6), sowie Nuclear Factor- κ B (NF- κ B) auf. Außerdem zeigten diese Analysen einen Anstieg an Markern für oxidativen Stress und Apoptose, sowie eine Einschränkung des Fettsäuremetabolismus (Jeganathan et al., 2017). Viele inflammatorische Marker, wie CRP, Interleukin-6 (IL-6), TNF- α , Interleukin 8 (IL-8), wurden bereits im Zusammenhang mit VHF erhöht nachgewiesen (Harada et al., 2015b). Inflammatorische Prozesse bedingen somit oxidativen Stress und eine beeinträchtigte Fettsäureoxidation; beides resultiert in einer mitochondrialen Dysfunktion (Jeganathan et al., 2017). Auch eine direkte Hemmung der CytOx durch Tumornekrosefaktor α (TNF- α) bei akuter Inflammation kann eine mitochondriale Dysfunktion bedingen (Hüttemann et al., 2012). Diese Dysfunktion führt zu einer ATP-Depletion und somit zu einem Energiedefizit. So konnte eine Behandlung von Mitochondrien aus Hepatozyten der Maus mit TNF- α eine 35%-64%ige zelluläre ATP-Reduktion bewirken (Samavati et al., 2008, Hüttemann et al., 2012). Bei VHF könnte demnach eine akute

Inflamationsreaktion bestehen, welche zu einem Energiedefizit führt und das VHF dadurch aufrechterhält. Ein operativer Eingriff verursacht eine inflammatorische Reaktion, welche mit höherer Wahrscheinlichkeit zur Ausbildung eines VHF führen kann. Es wird diskutiert, ob die veränderte mitochondriale Atmung bei VHF durch microRNAs (miRNAs) vermittelt wird (Li et al., 2012, Luo et al., 2010, Wang et al., 2011). MiRNAs sind kleine, nicht kodierende mRNA-Fragmente, welche eine zentrale Rolle in der Regulation einnehmen können (Wang et al., 2011). Slagsvold et al. zeigten, dass es signifikante Unterschiede der miRNA-Ausbildung bei Patienten mit und ohne VHF gibt. So zeigte sich im rechten Vorhof die miR-208a bei VHF erhöht, während die miR-451, miR-15b, miR-144 und miR-106b bei VHF vermindert exprimiert wurden (Slagsvold et al., 2014). Die miRNA 328 zeigte sich ebenfalls bei VHF erhöht. Diese miRNA greift in das elektrische Remodeling bei VHF durch Veränderung von L-Typ Calciumkanälen ein (Lu et al., 2010). Diese Ergebnisse implizieren eine Beteiligung von miRNAs in der Pathogenese von VHF.

Bei den vorliegenden Untersuchungsergebnissen handelt es sich um eine mRNA Expressionsanalyse im Myokard unter klinischen Bedingungen. Eine Vielzahl von Faktoren beeinflussen diese Analyse, welche sich bei der Auswahl eines kardiochirurgischen Patientenguts nicht vollständig ausschließen lassen. Andererseits wird jedoch nur durch den kardiochirurgischen Zugang eine ausreichende Menge an Biopsiematerial zur weiteren Bearbeitung zugänglich. In der weiteren Diskussion sollen daher Aspekte des Lipidstoffwechsels, des Diabetes mellitus und der mechanischen Vorhofbelastung als Beispiele für Einflussfaktoren erläutert werden.

4.4.1 Lipide

Lipide sind Hauptenergielieferanten des Herzens. Das Herz hält ein Gleichgewicht zwischen Aufnahme, Metabolismus und Oxidation von Lipiden. Infolge einer verstärkten Aufnahme, wie bei Adipositas und Diabetes mellitus, kommt es zu einer pathologischen Akkumulation von Lipiden (D'Souza et al., 2016, Zlobine et al., 2016). Erhöhtes Plasma-Cholesterol, insbesondere das low density Protein (LDL), sind Hauptrisikofaktoren für kardiovaskuläre Erkrankungen (Catapano und Wiklund, 2015). Das Schlüsselenzym in der Synthese von Cholesterol ist die β -HMG-CoA-Reduktase. Durch Statine wird dieses Enzym gehemmt (Grundy, 1988). Emelyanova et al. zeigten, dass unter Statinbehandlung

der Sauerstoffverbrauch von Myozyten abnimmt und eine Differenzierung von Myofibroblasten, einer Vorstufe der kardialen Fibrose, aufgehalten wird (Emelyanova et al., 2019). Dadurch haben Statine einen Einfluss auf den bioenergetischen Stoffwechsel von Kardiomyozyten. Eine Medikation mit Simvastatin bei Angiotensin II induzierter Herzinsuffizienz zeigte laut Hsieh et al. eine Verbesserung (Ökonomisierung) der mitochondrialen Funktion durch Reduktion der ROS-Produktion und Stabilisierung des Membranpotentials (Hsieh et al., 2019). Demgegenüber haben Statine einen negativen Effekt auf die Skelettmuskulatur. Larsen et al. zeigten, dass es bei Einnahme von Simvastatin zu einer Verringerung des mitochondrialen Kofaktors Coenzym Q und einer reduzierten Kapazität der oxidativen Phosphorylierung in Skelettmuskulatur kommt (Larsen et al., 2013). High density Lipoprotein (HDL) hat im Gegensatz zum LDL antiinflammatorische, antioxidative und antithrombotische Eigenschaften. Im Zusammenhang mit VHF wurde ein reduzierter Gehalt an HDL mit verminderter HDL-Cholesterol-Efflux-Kapazität im Serum beschrieben (Trieb et al., 2019). Der HDL-Cholesterol Efflux ist die Fähigkeit des HDLs, Cholesterol aus Makrophagen aufzunehmen und trägt somit zur Kardioprotektivität bei (Qiu et al., 2017).

Es wird ein Zusammenhang zwischen VHF und epikardialen Fettgewebe beschrieben (Abe et al., 2018). Eine Fibrosierung des epikardialen Fettgewebes geht mit erhöhten proinflammatorischen und profibrotischen Cytokinen und Chemokinen (IL-6, TNF- α , HIF-1 α , VEGF, Matrix Metalloprotease-2 und 9, MMP-2 und 9) einher und korreliert mit linksatrialer Fibrose (Abe et al., 2018). Nakamori et al. zeigten, dass das Volumen von epikardialen Fettgewebe bei Patienten mit VHF deutlich erhöht ist (Nakamori et al., 2018). Eine Medikation mit Simvastatin zeigte nicht nur eine Reduktion des epikardialen Fettgewebsvolumens, sondern auch des Gehaltes an Cytokinen wie IL-6 (Grosso et al., 2014). Diese Ergebnisse sprechen für einen myokardprotektiven Effekt von Statinen hinsichtlich einer Initiierung und Aufrechterhaltung eines VHF.

Das Cardiolipin ist ein mitochondriales Glycerophospholipid, welches in der inneren Mitochondrienmembran nachgewiesen wurde und welches an Komplexe der Atmungskette gebunden ist. Cardiolipin befindet sich auch an und in der CytOx (Musatov und Robinson, 2014). 2-4 Cardiolipinmoleküle existieren innerhalb eines Monomers der CytOx, sind hierbei an die Untereinheiten III, VIb, VIIa gebunden und ermöglichen eine Dimerisierung der CytOx (Shinzawa-Itoh et al., 2007). Musatov et al. zeigten, dass die Stöchiometrie H^+/e^- der CytOx nur in Anwesenheit von Cardiolipin aufrechterhalten werden

kann, da die Protonentranslokation des Enzyms von Cardiolipin abhängig ist (Musatov und Robinson, 2014). Laut Ozerova et al. hat die Einnahme von Simvastatin keine Auswirkung auf den Anteil an Cardiolipin im Plasma (Ozerova et al., 2001), jedoch ist bekannt, dass Simvastatin die mitochondriale Funktion, die ROS-Produktion und das mitochondriale Membranpotential beeinflusst.

4.4.2 Diabetes mellitus

Diabetes mellitus ist mit einem erhöhten Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen assoziiert. Dabei konnte gezeigt werden, dass Diabetes mellitus Typ 2 ebenfalls zu einer mitochondrialen Dysfunktion, vermehrter ROS-Produktion und einem ATP-Defizit führt (Rovira-Llopis et al., 2017, Kanaan et al., 2019). Die metabolischen Veränderungen resultieren in Remodelingprozessen des Myokards, welche ein deutlich erhöhtes Risiko für die Ausbildung eines VHF bei Diabetes mellitus bedingen (Goudis et al., 2015). Bombicino et al. zeigten jedoch, dass es ohne bestehende strukturelle Veränderungen des Herzmuskels bei Diabetes mellitus zu einer mitochondrialen Dysfunktion kommt. Bei Hyperglykämie trat eine verminderte mitochondriale Sauerstoffaufnahme mit reduzierter oxidativer Phosphorylierung und erhöhter ROS-Produktion auf (Bombicino et al., 2016).

Im Myokard besteht bei VHF ein erhöhter Energiebedarf der Kardiomyozyten (Kanaan et al., 2019). Der erhöhte Energiebedarf kann zum Teil gedeckt werden, indem veränderte Superkomplexformationen für eine effizientere Energiegewinnung gebildet werden. Gerade bei Diabetes mellitus kommt es zu diesen Veränderungen der Superkomplexformation (Greggio et al., 2017). Laut Kanaan et al. wiesen Patienten mit Diabetes mellitus und bestehendem VHF eine beeinträchtigte Aktivität von Komplex I der Atmungskette, sowie eine veränderte Superkomplexformation auf (Kanaan et al., 2019). Daher ist es wahrscheinlich, dass sowohl VHF als auch Diabetes mellitus mit oxidativem Stress und inflammatorischen Prozessen assoziiert sind. Beide pathologische Mechanismen führen zu metabolischem, elektrischem und strukturellem Remodeling und bilden ein Substrat für VHF (Karam et al., 2017). Die untersuchte Patientengruppe mit Diabetes mellitus zeigte bezüglich der Expression der Hypoxiemarker und der Isoformen der CytOx 4 im Vergleich zu der Kontrollgruppe keine Unterschiede (siehe Abbildung 17). Innerhalb der Patientengruppe mit Diabetes deutete sich jedoch bezüglich einer CytOx 4.1 Expression eine Erhöhung bei VHF gegenüber der Gruppe mit Sinusrhythmus an. Da ein Einfluss

dieser Grunderkrankung auf die Funktion der Untereinheiten der CytOx nicht auszuschließen ist, wurden die Patienten mit Diabetes mellitus in der Auswertung nicht berücksichtigt.

4.4.3 Vorhofdehnung

Es ist allgemein bekannt, dass die Vorhofdehnung zu den wichtigsten Risikofaktoren für die Ausbildung eines VHF zählt (Haverkamp, 2018). Chronische Dehnung der Vorhöfe bewirkt eine Veränderung von Signalwegen, was zu VHF führen kann. Eine Dehnung des Vorhofmyokards zeigt ausgeprägtere Reaktionen als eine Dehnung des Ventrikelmyokards (Hanna et al., 2004). Kalifa et al. zeigten, dass es durch erhöhten intraatrialen Druck zu einer vermehrten Entstehung von Erregungswellen an Pulmonalvenen kommt (Kalifa et al., 2003). Ebenfalls wurde eine durch die Dehnung verursachte Verkürzung der Refraktärperiode als ursächlich für eine erhöhte Vulnerabilität für VHF beschrieben (Ravelli und Allessie, 1997). Die strukturellen Veränderungen des Myokards durch Druck und Volumenbelastung werden durch einen Angiotensin II-abhängigen, und einen Angiotensin II-unabhängigen Mechanismus induziert (Schotten et al., 2011). Mechanischer Stress aktiviert die extrazelluläre signalbezogene Kinase (ERK) und die c-Jun N-terminale Kinase (JNK), wobei nur ERK durch Angiotensin II aktiviert wird (Li et al., 2001). ERK wiederum aktiviert profibrotische Signalwege und führt zu strukturellem Remodeling (Nattel, 2017). Der Energiemetabolismus der Kardiomyozyten zeigte sich durch dehnungsinduziertes VHF ebenfalls beeinträchtigt. Nach einer Stunde von dehnungsinduziertem VHF wurde ein reduzierter Gehalt an ATP und Phosphokreatin im Myokard beschrieben (Kalifa et al., 2008). Es deutet sich in Abbildung 13 an, dass es bei VHF mit zunehmender Größe des Vorhofs zu einem Anstieg der Expression der Isoform 4.2 kommt.

4.5 Perspektiven der Therapie

Die gegenwärtigen medikamentösen Therapieoptionen bei VHF weisen eine große Anzahl von Nebenwirkungen auf. Durch das bessere Verständnis der Pathophysiologie bei der Entstehung eines VHF ergeben sich neue therapeutische Optionen. Insbesondere die Änderung der präventiven antiarrhythmischen Therapie nach erfolgreicher Kardioversion

oder Ablation wird aktuell diskutiert (Gasparova et al., 2017). Die inflammatorischen Prozesse und der oxidative Stress bei VHF zählen zu den wichtigsten Zielen aktueller Therapierichtlinien (Karam et al., 2017). Die antioxidative Medikation bei oxidativem Stress basiert auf verschiedenen Ansätzen. Vitamin C und E wirken antioxidativ und oral supplementiertes Vitamin C zeigte in klinischen Studien bereits eine Risikoreduktion für das erneute Auftreten von VHF (Korantzopoulos et al., 2005). Mehrfach ungesättigte Fettsäuren wirken antiinflammatorisch und antioxidativ, die Ergebnisse in Bezug auf VHF werden jedoch kontrovers diskutiert (Calò et al., 2005, Saravanan et al., 2010). Statine reduzieren neben Cholesterol auch die Aktivität der Nicotinamid Adenin Dinucleotid Phosphatoxidase (NAD(P)H- Oxidase), welche oxidative Vorgänge initiiert (Gasparova et al., 2017). Es zeigte sich insbesondere für die Einnahme von hochdosiertem AtorvastatinTM eine Reduktion der postoperativen Inzidenz von VHF bei herzchirurgischen Patienten (Pierri et al., 2016). Außerdem sind NO-Donoren, N-Acetylcystein, Calciumkanal-Antagonisten und die Gentherapien, zum Beispiel in Bezug auf das protektive Gen Hämoxygenase-1 (HO-1), im Zentrum aktueller Forschungen (Gasparova et al., 2017). Die antiinflammatorischen Therapieansätze beinhalten auch das Pioglitazon, welches zusätzlich zum Glucosestoffwechsel in die TGF- β und TNF- α -Signalkaskade eingreift. Außerdem ist dabei eine ROS-Reduktion beschrieben. Somit hat Pioglitazon sowohl antiinflammatorische als auch antioxidative Eigenschaften (Karam et al., 2017). Dipeptidyl Peptidase (DPP-4) Inhibitoren induzieren eine Glucagon- und Insulinsekretion. Außerdem weisen sie auch antiinflammatorische, antioxidative und antifibrotische Effekte auf, welche die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von VHF reduzieren können (Bostick et al., 2014, Karam et al., 2017). Diese Forschungsansätze sind vielversprechend, jedoch werden weitere klinische Studien benötigt, um den Einsatz in der klinischen Routine zu ermöglichen.

4.6 Stellenwert der Isoform 4.2 in der Pathogenese des VHF

Generell ergibt sich bezüglich der gemessenen Expression der Untereinheit 4.2 die Frage, ob die Veränderungen Folge oder Ursache für das VHF darstellen.

In der Pathogenese des VHF spielt die kardiale Fibrose eine zentrale Rolle (Heijman et al., 2016). Daher müssen zunächst die der Fibrose zugrundeliegenden zellulären und molekularen Mechanismen verstanden werden. Wenn Fibroblasten durch profibrotische

Stimuli aktiviert werden, differenzieren sie sich zu Myofibroblasten, welche sekretorische Eigenschaften haben. Durch diese Differenzierung kommt es zu einer Akkumulation von Proteinen der extrazellulären Matrix (Prokollagen, Matrix-Metalloproteasen) perivaskulär und im Perimysium (Nattel, 2017). Dieser Vorgang wird reaktive Fibrose genannt und bezeichnet eine Vermehrung von fibrotischen Substanzen außerhalb der Kardiomyozyten. Die sogenannte reparative Fibrose tritt nach Schädigung des Myokards, z.B. nach Infarkten, auf. Dabei existieren eine Vielzahl von profibrotischen Signalwegen. Wichtige involvierte Rezeptoren sind der konnektive Gewebewachstumsfaktor (CTGF), Angiotensin II, Plättchen-abgeleiteter Wachstumsfaktor (PDGF) und der transformierende Wachstumsfaktor β (TGF- β). Eine vermehrte ROS-Produktion resultiert aus der Aktivierung des Angiotensin-II und des TGF- β Rezeptors (Youn et al., 2013). Insgesamt führen diese Signalwege durch Phosphorylierungen, positive Feedbackmechanismen und ROS zu einer vermehrten Produktion von extrazellulärer Matrix (Nattel, 2017). In der Regulation von Fibroblasten haben Kalziumkanäle eine zentrale Bedeutung. Über den durch Kalzium aktivierten extrazellulären Kinase- (ERK-) Signalweg wird eine kardiale Fibrose verstärkt (Nattel, 2017). Eine exzessive Produktion von ROS spielt ebenfalls eine zentrale Rolle im elektrischen und strukturellen Remodeling bei VHF. Die NAD(P)H-Oxidase (NOX) wurde dabei als wesentliche Quelle für diese ROS identifiziert. Sie kann durch Angiotensin II und im Zuge einer Vorhofdehnung aktiviert werden (Youn et al., 2013). Laut Elahi et al. gilt die NOX als wichtigste Quelle für ROS-Produktion besonders im Vorhofmyokard und ist mit VHF assoziiert (Elahi et al., 2008). Die Aktivität der NOX in den Vorhöfen wurde als Risikofaktor von postoperativem VHF beschrieben (Kim et al., 2008). Kim et al. zeigten, dass Angiotensin II inflammatorische Marker wie TNF- α und TGF- β induziert. Außerdem führt Angiotensin II zu einer reduzierten basalen Sauerstoffverwertung (OCR) von atrialen Kardiomyozyten, vermehrter Produktion von ROS und erhöhtem intrazellulärem Kalzium. Diese Faktoren resultieren in einer Aktivierung durch Phosphorylierung der AMP-aktivierten-Proteinkinase (AMPK) (Kim et al., 2017b). Die Aktivierung der AMPK führt zur Aufrechterhaltung des Kalziumstoffwechsels und Erhaltung der Kontraktilität des Myokards (Harada et al., 2015a). Wenn diese kompensatorischen Mechanismen versagen, trägt dies zu **Chronifizierung des VHF**s bei (Harada et al., 2015a). Andererseits zeigten Kim et al., dass die AMPK auch Teil eines inflammatorischen Signalweges ist, welcher durch Angiotensin II induziert wird und zur Aufrechterhaltung von VHF durch Entzündungsprozesse beiträgt (Kim et al., 2017b). Die Myokardfibrose wird durch eine Vielzahl an klinischen Faktoren verstärkt. Adipositas ist

ein bekannter Risikofaktor für VHF. Dauerhaft bestehende inflammatorische Prozesse, Remodelingprozesse mit Fibrose und Lipideinlagerungen in den Vorhöfen und oxidativer Stress ohne ausreichende antioxidative Mechanismen prädestinieren für die Initiierung und Aufrechterhaltung von VHF (Lubbers et al., 2018). Somit ist anzunehmen, dass die Veränderung der Expression der Isoformen in der CytOx in Anbetracht einer postulierten Sauerstoffunterversorgung des Myokards einen Kompensationsmechanismus darstellt. Laut der Expertisen von Kocha et al. und Schiffer et al. kommt es durch die Erhöhung der Isoform 4.2 zu einer Ökonomisierung der Energieproduktion und einer Verminderung der ROS Freisetzung (Kocha et al., 2015, Schiffer et al., 2016). In der Veränderung der Expression der Isoformen könnte somit ein **Reparationsmechanismus des Myokards** bei VHF gesehen werden.

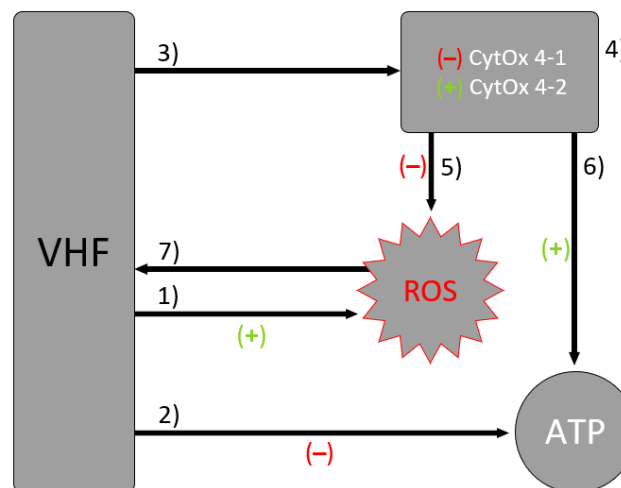


Abbildung 19: Potentieller Kompensationsmechanismus bei VHF. Bei VHF entstehen vermehrt toxische ROS (1) und es besteht ein gestörter mitochondrialer Energiemetabolismus (2). Durch die relative Hypoxie bei VHF kommt es zu einer verminderten Expression der Isoform 4.1 und vermehrten Expression der Isoform 4.2 der CytOx (3, 4). Aufgrund der vermehrten Expression der Isoform 4.2 entstehen weniger ROS (5) und die Energiegewinnung der Atmungskette wird effizienter (6). Die geringere Menge an zytotoxischen ROS könnte partiell eine weitere Myokardschädigung verhindern (7).

Die gestörte myokardiale Sauerstoffutilisation bei VHF war Ausgangspunkt für die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit:

1. In der Zellkultur zeigte sich bei den Zellen nach 8-stündiger Hypoxiebehandlung eine geringere Expression von HIF-1 α , jedoch eine tendenziell höhere Expression von VEGF-B. HIF-1 α akkumuliert bei Hypoxie und induziert in der Folge Zielgene, inklusive VEGF (Zimna und Kurpisz, 2015). Da HIF-1 α in diesem Experiment nach 8 Stunden

Hypoxiebehandlung gering exprimiert wird, sich VEGF-B hingegen tendenziell erhöht zeigt, ist davon auszugehen, dass sich die Hypoxie nach 8 Stunden an einem Punkt der Chronifizierung befindet. Dabei zeigte sich nach der Hypoxiebehandlung eine erhöhte Expression von COX 4.2. Dies bestätigt die Annahme (Horvat et al., 2006), dass es bei anhaltender Hypoxie zu einer Erhöhung der COX 4.2 kommt (Abbildung 5).

2. Das untersuchte Patientenkollektiv wurde in eine Gruppe mit Sinusrhythmus und eine mit VHF aufgeteilt. Die Vergleichbarkeit beider Gruppen ist durch den weitgehenden Ausschluss von Unterschieden in klinischen Parametern gegeben (siehe Tabelle 11). Es zeigten sich jedoch keine eindeutigen Zeichen einer Chronifizierung der Hypoxie, da sich die Expression von VEGF-B bei VHF und Sinusrhythmus nicht signifikant unterscheidet (Abbildung 6). Angedeutet lässt sich jedoch eine Tendenz der vermehrten Expression von VEGF-B aufzeigen, sodass im Hinblick auf eine größere Patientengruppe eine Unterscheidbarkeit sichtbar werden könnte. Aufgrund der bekannten mitochondrialen Dysfunktion bei Diabetes mellitus wurden die Patienten mit dieser Erkrankung ausgeschlossen, obwohl im direkten Vergleich keine Unterschiede in den Expressionen gefunden wurden (siehe Abbildung 16, Tabelle 11). Nach Ausschluss der Patienten mit Diabetes mellitus wurden jedoch erst unterschiedliche Expressionen sichtbar (Abbildung 10). Offensichtlich existieren weitere Regulationsmechanismen, welche bei Diabetes mellitus die Energiegewinnung beeinflussen und noch nicht ausreichend verstanden sind.

3. Die Expressionen von HIF-1 α und VEGF-B bei der Patientengruppe mit Sinusrhythmus und der mit VHF unterscheiden sich nicht eindeutig (Abbildung 6). Die Ausdehnung des koronaren Gefäßbefalls hat keinen Einfluss auf die Expressionen von HIF-1 α und VEGF-B (Abbildung 7). Unter Ausschluss von Diabetikern kann keine eindeutige Aussage getroffen werden, ob sowohl die Chronifizierung der KHK als auch das Vorhandensein einer Ein- oder Mehrgefäßerkrankung mit dem Auftreten eines VHF korrelieren (Abbildung 8).

4. Es wurde ein VEGF/HIF Quotient gebildet, welcher Hinweise auf Chronifizierung einer Hypoxie geben kann. Es wurde eine „akute Hypoxie“ bei Werten von <1 , sowie eine „chronische Hypoxie“ bei Werten von >1 postuliert. Die Expressionen von COX 4.1 und COX 4.2 bei akuter und chronischer Hypoxie zeigten jedoch keine Unterschiede (Abbildung 9).

5. Mit der Einführung eines COX 4.2/4.1 Quotienten wurden Unterschiede der Expressionen zwischen Sinusrhythmus und VHF offensichtlich (Abbildung 10). Horvath et al. nutzten diesen Quotienten, um die Expression der Isoform 4.2 gegen 4.1 zu normalisieren, unter der Annahme, dass COX 4.1 die Funktion eines Housekeeping-Gens erfüllt. Es zeigte sich ein Anstieg dieses Quotienten bei Hypoxie (Horvat et al., 2006). In Abbildung 10 wird gezeigt, dass sich sowohl die Expression der Isoform 4.1 als auch der Quotient der Expressionen 4.2/4.1 zwischen den Gruppen mit Sinusrhythmus und mit VHF unterscheidet. Der unterschiedliche 4.2/4.1 Quotient ist offensichtlich auch durch eine Reduktion der Isoform 4.1 bedingt. Diese Beobachtung widerspricht jedoch nicht der Annahme einer vermehrten 4.2 Expression, da es laut Fukuda et al. zu einer Degradierung von COX 4.1 und zusätzlich einer Induktion der Isoform 4.2 kommt. Die Degradierung der Isoform 4.1 findet durch eine HIF-1 α -induzierte mitochondriale Proteinkinase LON statt, während es zu einer ebenfalls HIF-1 α induzierten vermehrten Expression der Isoform 4.2 kommt. Dadurch soll eine effizientere Energiegewinnung durch die CytOx gewährleistet werden (Fukuda et al., 2007). Diese Ergebnisse sprechen jedoch gegen eine Housekeeping-Funktion der Isoform 4.1 in humanem Gewebe. Laut Emelyanova et al. verändert sich die funktionelle Aktivität der Cytochrom-c-Oxidase bei VHF nicht (Emelyanova et al., 2016). Demnach sprechen die Ergebnisse für eine chronische Hypoxie bei VHF, welche vermittelt durch den HIF-1 α Signalweg zu einer vermehrten Expression der Isoform 4.2 und einer reduzierten Expression der Isoform 4.1 führt. Die funktionelle Aktivität wird somit trotz Hypoxie aufrechterhalten. Diese Regulation der Isoformen ist vom Ausmaß der KHK unabhängig (Abbildung 11). Unter Ausschluss der Patienten mit Mehrgefäßkrankheit zeigte sich beim Vergleich der Patientengruppe mit Sinusrhythmus und der mit VHF lediglich eine angedeutete Tendenz in der erwarteten Regulation der Isoformen (Abbildung 12). Dabei gilt es zu berücksichtigen, dass die Blutversorgung der Vorhöfe und insbesondere des Reizleitungssystems nicht unbedingt mit der Ausprägung der KHK korreliert. Weiterhin muss darauf hingewiesen werden, dass für die vorliegenden Untersuchungen Gewebeproben aus dem rechten Vorhof verwendet wurden und das Ausmaß der Beeinträchtigung der Durchblutung auch bei einer Mehrgefäßerkrankung variieren kann.

6. Bei verstärkter mechanischer Belastung der Vorhöfe (Dehnung) bei VHF muss angenommen werden, dass es zu Durchblutungsstörungen kommt. Es konnte gezeigt werden, dass der myokardiale Blutfluss bei Patienten mit VHF und atrialer Belastung sowohl vor

als auch nach erfolgreicher Ablation eingeschränkt ist (Wijesurendra et al., 2018). Während des VHF ist die koronare Reserve vermindert, vor allem in der subendokardialen Schicht (Kochiadakis und Kallergis, 2012). Die lineare Regression in Abbildung 13 deutet an, dass die Expression der Isoform 4.2 bei VHF mit größerem Vorhofdurchmesser ansteigt. Jedoch ist eine größere Patientenzahl nötig, um diese Tendenz zu verdeutlichen. Zu berücksichtigen ist hierbei, dass es sich bei den untersuchten Proben um Gewebe aus dem rechten Vorhof handelt, während für die Auswertung der Durchmesser des linken Vorhofs in der Echokardiographie vermessen wurde.

7. Es ergaben sich Hinweise auf den akuten Einfluss einer Myokardischämie bei der Ausbildung von VHF auf der Grundlage der Grunderkrankung KHK. Abbildung 14 zeigt die erhöhte Expression von VEGF-B bei einer akut auftretenden Angina Pectoris-Symptomatik. In diesem Stadium ist eine akute myokardiale Hypoxie auf der Basis der Grunderkrankung anzunehmen. Wir finden in diesem Stadium eine Erhöhung von ROS im Serum der Patienten (Vogt et al., 2004), was durch eine deutliche Reduktion der antioxidativen Kapazität des Serums nachgewiesen wurde. Die Initiierung einer Neovaskularisation wird durch ROS vermittelt; dies induziert einen Anstieg von VEGF (Lam, 2015, Jain et al., 2018, Wang et al., 2016).

8. Die Einnahme von Statinen ist mit mitochondrialer Dysfunktion assoziiert. Ubiquinon, ein Elektronentransportprotein der Atmungskette, wird durch Statineinnahme vermindert (Marcoff und Thompson, 2007). Da Ubiquinon antioxidative Eigenschaften besitzt, kann es bei vermindertem Gehalt an Ubiquinon zu einer unterschiedlichen ROS-Produktion kommen (Broniarek und Jarmuszkiewicz, 2016). Außerdem kommt es bei Statineinnahme zu einer reduzierten Effizienz der oxidativen Phosphorylierung durch Inhibition der Atmungskette (Marcoff und Thompson, 2007). Durch eine Entkopplung der Atmungskette und somit Reduktion des Membranpotentials kommt es zu einer erhöhten Durchlässigkeit der inneren mitochondrialen Membran. Dadurch werden Apoptosesignalwege initiiert (Qi et al., 2013, Broniarek und Jarmuszkiewicz, 2016). Insgesamt resultiert somit ein statininduzierter oxidativer Stress, welcher zu zellulären Schäden durch exzessive ROS-Produktion führen kann (Boutbir et al., 2016). Abbildung 15 zeigt, dass die mRNA Expression der Isoform 2 Untereinheit 4 der CytOx bei der Einnahme von Statinen tendenziell erhöht ist. Dies ist möglicherweise eine weitere Veränderung der Atmungskette bei Statineinnahme, welche in bisherigen Untersuchungen noch nicht berücksichtigt wurde. Es werden größere Patientenzahlen benötigt, um diese Tendenz zu

bestätigen. Laut Chowdhury et al. trägt dysfunktionelles Cardiolipin dazu bei, dass die Regulationswege durch HIF-1 α eingeschränkt ablaufen und zu einer Kardiomyopathie führen können (Chowdhury et al., 2018). Unter der Voraussetzung, dass eine Statintherapie den Cardiolipinhaushalt beeinflusst, kann angenommen werden, dass die Einnahme von Statinen ebenfalls einen Einfluss auf den HIF-1 α -Signalweg besitzen könnte und darüber die Isoform 4.2 der CytOx induziert.

5. Zusammenfassung

Die Pathogenese des Vorhofflimmerns (VHF) ist nach wie vor nicht vollständig geklärt. Es ist bekannt, dass der mitochondriale Energiestoffwechsel eine wichtige Rolle in der Pathogenese dieser Erkrankung einnimmt. Während des VHF kommt es zu einer veränderten Enzymaktivität in der Atmungskette und zu einer relativen Myokardhypoxie. Die Cytochrom-c-Oxidase (EC 1.9.3.1., CytOx), Komplex IV der Atmungskette, stellt das Schrittmacherenzym für die Elektronenübertragung in der Atmungskette dar. Ihre Untereinheit 4 besitzt eine essenzielle Rolle für die Funktion des Enzyms und damit auch eine Kontrollfunktion über den gesamten Prozess der oxidativen Phosphorylierung. Die Expression der Isoform 4.2 in der Untereinheit 4 des Enzyms ist von der zellulären Sauerstoffkonzentration abhängig. Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Klärung, inwieweit VHF von einer vermehrten Expression der Isoform 4.2 der CytOx begleitet wird.

In dem Modell einer Zellkultivierung von HeLa-Zellen konnte gezeigt werden, dass eine vermehrte Expression der Isoform 4.2 während einer protrahierten Hypoxie besteht.

Bei 42 kardiochirurgischen Patienten wurden während des operativen Eingriffs Myokardbiopsien aus dem rechten Vorhof entnommen. Dabei wiesen 11 Patienten ein permanentes VHF auf. 31 Patienten mit Sinusrhythmus dienten als Vergleichsgruppe. Es wurde eine mRNA-Analyse zum Nachweis der Expression der Isoformen 4.1 und 4.2 der CytOx durchgeführt. Parallel dazu erfolgte eine Quantifizierung der mRNA Expression von HIF-1 α und VEGF-B, um eine Aussage hinsichtlich der Sauerstoffversorgung treffen zu können.

Die Auswertung eines 4.2/4.1 Quotienten bei der mRNA-Expressionsanalyse ergab einen Unterschied zwischen der Patientengruppe mit permanentem VHF bzw. mit Sinusrhythmus. Dabei zeigte sich eine vermehrte Expression der Isoform 4.2 bei verminderter Expression der Isoform 4.1 im Myokard. Aufgrund von Hinweisen auf eine mitochondriale Dysfunktion bei Diabetes mellitus wurden diese Patienten bei der Auswertung nicht berücksichtigt. Es konnte gezeigt werden, dass die erhöhte Expression der Isoform 4.2 unabhängig vom Ausmaß des Gefäßbefalls bei einer KHK auftritt. Weiterhin deutet sich an, dass die Einnahme von Statinen und die damit verbundene Beeinflussung des Lipidstoffwechsels die Expression der Isoform 4.2 verändert. Es kann vermutet werden, dass eine

Zunahme des linksatrialen Durchmessers bei VHF von einer erhöhten Expression der Isoform 4.2 begleitet wird.

Die Veränderung der Isoform-Expression in der CytOx könnte in Anbetracht einer Sauerstoffunterversorgung des Myokards (Erhöhung von VEGF-B-Expression) einen Kompensationsmechanismus darstellen. Durch die Erhöhung der Isoform 4.2 kommt es zu einer Ökonomisierung der Energieproduktion und einer Verminderung der ROS-Freisetzung. Die Veränderung der Expression der Isoformen könnte somit einen Reparations- und/oder Regenerationsmechanismus des Myokards bei VHF darstellen.

6. Summary

The pathogenesis of atrial fibrillation (AF) and underlying mechanisms remain poorly understood. It is well known that a deficit in the mitochondrial energy metabolism can contribute to the progression of the substrate for AF. During AF the activity of the respiratory chain alters and the myocardial oxygen extraction increases, resulting in a state of relative hypoxia. Cytochrome c oxidase (EC 1.9.3.1., CytOx), representing complex IV of the respiratory chain, catalyzes the rate-limiting step in the electron transfer to Dioxygen. Therein, subunit 4 of the enzyme is the key regulatory subunit and fundamentally required for the enzymatic activity. Accordingly, it has control function for the entire process of oxidative phosphorylation. Expression of isoform 4.2 is dependent on cellular oxygen content and optimizes the efficiency of respiration at low oxygen levels. This study is to address the mRNA expression of subunit 4 isoforms of the cytochrome c oxidase in case of AF.

Examining a HeLa-cell-line cell culture under normoxia and conditions of oxygen deprivation, an increase in the expression of isoform 4.2 became apparent.

Myocardial biopsies of the right atrium were taken from 42 cardiac surgery patients. 11 patients suffered from permanent AF, whereas 31 patients with sinus rhythm represented the control group. The mRNA expressions of isoforms 4.1 and 4.2 of the cytochrome c oxidase were quantified. In order to evaluate hypoxic response, mRNA expressions of HIF-1 α and VEGF-B were examined.

The evaluation of cytochrome c oxidase isoform 4.2/4.1 ratio revealed an elevated isoform 4.2 expression accompanied by a decrease of the expression of isoform 4.1 in the patient group with permanent AF. Due to the known mitochondrial dysfunction, patients with diabetes mellitus were not considered. In this study the elevation of the expression of isoform 4.2 appeared independently of the severity of coronary artery disease. The suggestion is made that statin therapy and the consequential change in lipid metabolism lead to an altered isoform 4.2 expression. Supposedly, an increased isoform 4.2 expression is accompanied by an extended left atrial diameter in AF.

In conclusion, alterations in CytOx subunit 4 isoform expression during relative hypoxia in myocardial tissue (increase of VEGF-B expression) may serve as a compensatory

mechanism. The increase of isoform 4.2 within cytochrome c oxidase results in an optimized efficiency of the energy metabolism and a limitation of ROS production. All in all, the switch of isoform expression pattern may represent a reparatory and/or regenerative mechanism during AF.

7. Literaturverzeichnis

1. Abe H, Semba H, Takeda N (2017) The Roles of Hypoxia Signaling in the Pathogenesis of Cardiovascular Diseases. *J Atheroscler Thromb* 24: 884–894
2. Abe I, Teshima Y, Kondo H, Kaku H, Kira S, Ikebe Y, Saito S, Fukui A, Shinohara T, Yufu K, Nakagawa M, Hijiya N, Moriyama M, Shimada T, Miyamoto S, Takahashi N (2018) Association of fibrotic remodeling and cytokines/chemokines content in epicardial adipose tissue with atrial myocardial fibrosis in patients with atrial fibrillation. *Heart Rhythm* 15: 1717–1727
3. Acin-Perez R, Gatti DL, Bai Y, Manfredi G (2011) Protein phosphorylation and prevention of cytochrome oxidase inhibition by ATP: coupled mechanisms of energy metabolism regulation. *Cell Metab* 13: 712–719
4. Allen LA, Zhao XJ, Caughey W, Poyton RO (1995) Isoforms of yeast cytochrome c oxidase subunit V affect the binuclear reaction center and alter the kinetics of interaction with the isoforms of yeast cytochrome c. *J Biol Chem* 270: 110–118
5. Andrade J, Khairy P, Dobrev D, Nattel S (2014) The clinical profile and pathophysiology of atrial fibrillation: relationships among clinical features, epidemiology, and mechanisms. *Circ Res* 114: 1453–1468
6. Aras S, Pak O, Sommer N, Finley R, Hüttemann M, Weissmann N, Grossman LI (2013) Oxygen-dependent expression of cytochrome c oxidase subunit 4-2 gene expression is mediated by transcription factors RBPJ, CXXC5 and CHCHD2. *Nucleic Acids Res* 41: 2255–2266
7. Arjunan P, Lin X, Tang Z, Du Y, Kumar A, Liu L, Yin X, Huang L, Chen W, Chen Q, Ye Z, Wang S, Kuang H, Zhou L, Xu K, Chen X, Zeng H, Lu W, Cao Y, Liu Y, Zhao C, Li X (2018) VEGF-B is a potent antioxidant. *Proc Natl Acad Sci U S A* 115: 10351–10356
8. Arnold S und Kadenbach B (1997) Cell respiration is controlled by ATP, an allosteric inhibitor of cytochrome-c oxidase. *Eur J Biochem* 249: 350–354
9. Barichello S, Roberts JD, Backx P, Boyle PM, Laksman Z (2018) Personalizing therapy for atrial fibrillation: the role of stem cell and in silico disease models. *Cardiovasc Res* 114: 931–943

10. Barth AS und Tomaselli GF (2009) Cardiac metabolism and arrhythmias. *Circ Arrhythm Electrophysiol* 2: 327–335
11. Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L, Gatto GJ (2014) Biochemie. 7. Auflage, korrigierter Nachdruck Springer Spektrum Berlin, Heidelberg
12. Bert P (1982) Sur la richesse en hemoglobine du sang des animaux vivant sur les haut lieux. *Comptes rendus de l'Académie des Sciences* 94: 805–807
13. Bombicino SS, Iglesias DE, Mikusic IAR, D'Annunzio V, Gelpi RJ, Boveris A, Valdez LB (2016) Diabetes impairs heart mitochondrial function without changes in resting cardiac performance. *Int J Biochem Cell Biol* 81: 335–345
14. Bondurant MC und Koury MJ (1986) Anemia induces accumulation of erythropoietin mRNA in the kidney and liver. *Mol Cell Biol* 6: 2731–2733
15. Boron WF und Boulpaep EL (2012) Medical physiology. Updated 2nd ed. Saunders/Elsevier Philadelphia, PA
16. Bostick B, Habibi J, Ma L, Aroor A, Rehmer N, Hayden MR, Sowers JR (2014) Dipeptidyl peptidase inhibition prevents diastolic dysfunction and reduces myocardial fibrosis in a mouse model of Western diet induced obesity. *Metab Clin Exp* 63: 1000–1011
17. Bouitbir J, Singh F, Charles A-L, Schlagowski A-I, Bonifacio A, Echaniz-Laguna A, Geny B, Krähenbühl S, Zoll J (2016) Statins Trigger Mitochondrial Reactive Oxygen Species-Induced Apoptosis in Glycolytic Skeletal Muscle. *Antioxid Redox Signal* 24: 84–98
18. Broniarek I und Jarmuszkiewicz W (2016) Statyny a mitochondria. *Postepy Biochem* 62: 77–84
19. Brown DA und Moukdar F (2013) Are post-operative arrhythmias in patients with metabolic syndrome a sign of dysfunctional mitochondria? *J Am Coll Cardiol* 62: 1474–1475
20. Bruijn RFAG de, Heeringa J, Wolters FJ, Franco OH, Stricker BHC, Hofman A, Koudstaal PJ, Ikram MA (2015) Association Between Atrial Fibrillation and Dementia in the General Population. *JAMA Neurol* 72: 1288–1294
21. Buselmaier W und Haussig J (2018) Biologie für Mediziner. 14. Auflage Springer Berlin Heidelberg Berlin, Heidelberg
22. Calò L, Bianconi L, Colivicchi F, Lamberti F, Loricchio ML, Ruvo E de, Meo A, Pandozi C, Staibano M, Santini M (2005) N-3 Fatty acids for the prevention

- of atrial fibrillation after coronary artery bypass surgery: a randomized, controlled trial. *J Am Coll Cardiol* 45: 1723–1728
23. Catapano AL und Wiklund O (2015) Think Again About Cholesterol Survey. *Atherosclerosis Supplements* 20: 1–5
 24. Chen Y-R und Zweier JL (2014) Cardiac mitochondria and reactive oxygen species generation. *Circ Res* 114: 524–537
 25. Chowdhury A, Aich A, Jain G, Wozny K, Luchtenborg C, Hartmann M, Bernhard O, Balleiniger M, Alfar EA, Zieseniss A, Toischer K, Guan K, Rizzoli SO, Brügger B, Fischer A, Katschinski DM, Rehling P, Dudek J (2018) Defective Mitochondrial Cardiolipin Remodeling Dampens HIF-1 α Expression in Hypoxia. *Cell Rep* 25: 561–570.e6
 26. Chua S-K, Shyu K-G, Lin Y-F, Lo H-M, Wang B-W, Chang H, Lien L-M (2016) Tumor Necrosis Factor-Alpha and the ERK Pathway Drive Chemerin Expression in Response to Hypoxia in Cultured Human Coronary Artery Endothelial Cells. *PLoS ONE* 11: e0165613
 27. Claesson-Welsh L (2008) VEGF-B taken to our hearts: specific effect of VEGF-B in myocardial ischemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28: 1575–1576
 28. Davies RA, Kumar S, Chard RB, Thomas SP (2017) Surgical and Hybrid Ablation of Atrial Fibrillation. *Heart Lung Circ* 26: 960–966
 29. D'Souza K, Nzirorera C, Kienesberger PC (2016) Lipid metabolism and signaling in cardiac lipotoxicity. *Biochim Biophys Acta* 1861: 1513–1524
 30. Eckert N, Grunert D, Lenzen-Schulte M (2019) Nobelpreis für Medizin: Wenn Zellen außer Atem kommen. *Deutsches Ärzteblatt* 116: 1820–1822
 31. Elahi MM, Flatman S, Matata BM (2008) Tracing the origins of postoperative atrial fibrillation: the concept of oxidative stress-mediated myocardial injury phenomenon. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* 15: 735–741
 32. Ema M, Taya S, Yokotani N, Sogawa K, Matsuda Y, Fujii-Kuriyama Y (1997) A novel bHLH-PAS factor with close sequence similarity to hypoxia-inducible factor 1 α regulates the VEGF expression and is potentially involved in lung and vascular development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 4273–4278
 33. Emelyanova L, Ashary Z, Cosic M, Negmadjanov U, Ross G, Rizvi F, Olet S, Kress D, Sra J, Tajik AJ, Holmuhamedov EL, Shi Y, Jahangir A (2016) Selective downregulation of mitochondrial electron transport chain activity and

- increased oxidative stress in human atrial fibrillation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 311: H54-63
34. Emelyanova L, Sra A, Schmuck EG, Raval AN, Downey FX, Jahangir A, Rizvi F, Ross GR (2019) Impact of statins on cellular respiration and de-differentiation of myofibroblasts in human failing hearts. *ESC Heart Fail*
35. European Society of Cardiology (ESC), Deutsche Gesellschaft für Kardiologie (DGK) (2016) ESC Guidelines for the Management of Atrial Fibrillation. Birmingham, United Kingdom https://leitlinien.dgk.org/files/2016_Pocket-Leitlinie_VHF.pdf
36. Flamme I, Fröhlich T, Reutern M von, Kappel A, Damert A, Risau W (1997) HRF, a putative basic helix-loop-helix-PAS-domain transcription factor is closely related to hypoxia-inducible factor-1 α and developmentally expressed in blood vessels. *Mechanisms of Development* 63: 51–60
37. Fleige S, Walf V, Huch S, Prgomet C, Sehm J, Pfaffl MW (2006) Comparison of relative mRNA quantification models and the impact of RNA integrity in quantitative real-time RT-PCR. *Biotechnol Lett* 28: 1601–1613
38. Forsythe JA, Jiang BH, Iyer NV, Agani F, Leung SW, Koos RD, Semenza GL (1996) Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol Cell Biol* 16: 4604–4613
39. Fukuda R, Zhang H, Kim J-w, Shimoda L, Dang CV, Semenza GL (2007) HIF-1 regulates cytochrome oxidase subunits to optimize efficiency of respiration in hypoxic cells. *Cell* 129: 111–122
40. Garcia JGN und Ma S-F (2005) Polymerase chain reaction: a landmark in the history of gene technology. *Crit Care Med* 33: S429-32
41. Gasparova I, Kubatka P, Opatrilova R, Caprnda M, Filipova S, Rodrigo L, Malan L, Mozos I, Rabajdova M, Nosal V, Kobylak N, Valentova V, Petrovic D, Adamek M, Kruzliak P (2017) Perspectives and challenges of antioxidant therapy for atrial fibrillation. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 390: 1–14
42. Gleadle J und Ratcliffe P (2005) Hypoxia. *Encyclopedia of life sciences* 2005 839
43. Glickman MH und Ciechanover A (2002) The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol Rev* 82: 373–428

44. Goudis CA, Korantzopoulos P, Ntalas IV, Kallergis EM, Liu T, Ketikoglou DG (2015) Diabetes mellitus and atrial fibrillation: Pathophysiological mechanisms and potential upstream therapies. *Int J Cardiol* 184: 617–622
45. Goudis CA, Vasileiadis IE, Liu T (2018) Epicardial adipose tissue and atrial fibrillation: pathophysiological mechanisms, clinical implications, and potential therapies. *Curr Med Res Opin* 34: 1933–1943
46. Greggio C, Jha P, Kulkarni SS, Lagarrigue S, Broskey NT, Boutant M, Wang X, Conde Alonso S, Ofori E, Auwerx J, Cantó C, Amati F (2017) Enhanced Respiratory Chain Supercomplex Formation in Response to Exercise in Human Skeletal Muscle. *Cell Metab* 25: 301–311
47. Grosso AF, Oliveira SF de, Higuchi MdL, Favarato D, Dallan LAdO, da Luz PL (2014) Synergistic anti-inflammatory effect: simvastatin and pioglitazone reduce inflammatory markers of plasma and epicardial adipose tissue of coronary patients with metabolic syndrome. *Diabetol Metab Syndr* 6: 47
48. Grover FL, Fewel JG, Ghidoni JJ, Norton JB, Trinkle JK (1976) Effects of ventricular fibrillation on coronary blood flow and myocardial metabolism. *The American Journal of Cardiology* 37: 139
49. Grundy SM (1988) HMG-CoA reductase inhibitors for treatment of hypercholesterolemia. *N Engl J Med* 319: 24–33
50. Hanna N, Cardin S, Leung T-K, Nattel S (2004) Differences in atrial versus ventricular remodeling in dogs with ventricular tachypacing-induced congestive heart failure. *Cardiovasc Res* 63: 236–244
51. Harada M, Melka J, Sobue Y, Nattel S (2017) Metabolic Considerations in Atrial Fibrillation - Mechanistic Insights and Therapeutic Opportunities. *Circ J* 81: 1749–1757
52. Harada M, Tadevosyan A, Qi X, Xiao J, Liu T, Voigt N, Karck M, Kamler M, Kodama I, Murohara T, Dobrev D, Nattel S (2015a) Atrial Fibrillation Activates AMP-Dependent Protein Kinase and its Regulation of Cellular Calcium Handling: Potential Role in Metabolic Adaptation and Prevention of Progression. *J Am Coll Cardiol* 66: 47–58
53. Harada M, van Wagoner DR, Nattel S (2015b) Role of Inflammation in Atrial Fibrillation Pathophysiology and Management. *Circ J* 79: 495–502
54. Haverkamp W (2018) VHF up to date. 1. Auflage close2real Berlin

55. Heijman J, Algalarrondo V, Voigt N, Melka J, Wehrens XHT, Dobrev D, Nattel S (2016) The value of basic research insights into atrial fibrillation mechanisms as a guide to therapeutic innovation: a critical analysis. *Cardiovasc Res* 109: 467–479
56. Heijman J, Voigt N, Nattel S, Dobrev D (2014) Cellular and molecular electrophysiology of atrial fibrillation initiation, maintenance, and progression. *Circ Res* 114: 1483–1499
57. Helling S, Hüttemann M, Ramzan R, Kim SH, Lee I, Müller T, Langenfeld E, Meyer HE, Kadenbach B, Vogt S, Marcus K (2012) Multiple phosphorylations of cytochrome c oxidase and their functions. *Proteomics* 12: 950–959
58. Hershko A (2005) The ubiquitin system for protein degradation and some of its roles in the control of the cell-division cycle (Nobel lecture). *Angew Chem Int Ed Engl* 44: 5932–5943
59. Hogenesch JB, Chan WK, Jackiw VH, Brown RC, Gu YZ, Pray-Grant M, Perdew GH, Bradfield CA (1997) Characterization of a subset of the basic-helix-loop-helix-PAS superfamily that interacts with components of the dioxin signaling pathway. *J Biol Chem* 272: 8581–8593
60. Horvat S, Beyer C, Arnold S (2006) Effect of hypoxia on the transcription pattern of subunit isoforms and the kinetics of cytochrome c oxidase in cortical astrocytes and cerebellar neurons. *J Neurochem* 99: 937–951
61. Hsieh C-C, Li C-Y, Hsu C-H, Chen H-L, Chen Y-H, Liu Y-P, Liu Y-R, Kuo H-F, Liu P-L (2019) Mitochondrial protection by simvastatin against angiotensin II-mediated heart failure. *Br J Pharmacol* 176: 3791–3804
62. Hüttemann M (2000) New isoforms of cytochrome c oxidase subunit IV in tuna fish. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression* 1492: 242–246
63. Hüttemann M, Helling S, Sanderson TH, Sinkler C, Samavati L, Mahapatra G, Varughese A, Lu G, Liu J, Ramzan R, Vogt S, Grossman LI, Doan JW, Marcus K, Lee I (2012) Regulation of mitochondrial respiration and apoptosis through cell signaling: cytochrome c oxidase and cytochrome c in ischemia/reperfusion injury and inflammation. *Biochim Biophys Acta* 1817: 598–609
64. Hüttemann M, Lee I, Liu J, Grossman LI (2007) Transcription of mammalian cytochrome c oxidase subunit IV-2 is controlled by a novel conserved oxygen responsive element. *FEBS J* 274: 5737–5748

65. Hwang HJ, Lynn SG, Vengellur A, Saini Y, Grier EA, Ferguson-Miller SM, LaPres JJ (2015) Hypoxia Inducible Factors Modulate Mitochondrial Oxygen Consumption and Transcriptional Regulation of Nuclear-Encoded Electron Transport Chain Genes. *Biochemistry* 54: 3739–3748
66. Ivan M und Kaelin WG (2017) The EGLN-HIF O₂-Sensing System: Multiple Inputs and Feedbacks. *Mol Cell* 66: 772–779
67. Iyer NV, Kotch LE, Agani F, Leung SW, Laughner E, Wenger RH, Gassmann M, Gearhart JD, Lawler AM, Yu AY, Semenza GL (1998) Cellular and developmental control of O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 alpha. *Genes Dev* 12: 149–162
68. Jain T, Nikolopoulou EA, Xu Q, Qu A (2018) Hypoxia inducible factor as a therapeutic target for atherosclerosis. *Pharmacol Ther* 183: 22–33
69. Jansohn M (2012) *Gentechnische Methoden*. 5. Auflage Spektrum Akademischer Verlag; Imprint Heidelberg
70. Jeganathan J, Saraf R, Mahmood F, Pal A, Bhasin MK, Huang T, Mittel A, Knio Z, Simons R, Khabbaz K, Senthilnathan V, Liu D, Sellke F, Matyal R (2017) Mitochondrial Dysfunction in Atrial Tissue of Patients Developing Postoperative Atrial Fibrillation. *Ann Thorac Surg* 104: 1547–1555
71. Jelkmann W und Hellwig-Bürgel T (2001) Biology of erythropoietin. *Adv Exp Med Biol* 502: 169–187
72. Kadenbach B, Arnold S, Lee I, Hüttemann M (2004) The possible role of cytochrome c oxidase in stress-induced apoptosis and degenerative diseases. *Biochim Biophys Acta* 1655: 400–408
73. Kadenbach B und Hüttemann M (2015) The subunit composition and function of mammalian cytochrome c oxidase. *Mitochondrion* 24: 64–76
74. Kalifa J, Jalife J, Zaitsev AV, Bagwe S, Warren M, Moreno J, Berenfeld O, Nattel S (2003) Intra-atrial pressure increases rate and organization of waves emanating from the superior pulmonary veins during atrial fibrillation. *Circulation* 108: 668–671
75. Kalifa J, Maixent J-M, Chalvidan T, Dalmaso C, Colin D, Cozma D, Laurent P, Deharo J-C, Djiane P, Cozzone P, Bernard M (2008) Energetic metabolism during acute stretch-related atrial fibrillation. *Mol Cell Biochem* 317: 69–75

76. Kanaan GN, Patten DA, Redpath CJ, Harper M-E (2019) Atrial Fibrillation Is Associated With Impaired Atrial Mitochondrial Energetics and Supercomplex Formation in Adults With Type 2 Diabetes. *Can J Diabetes* 43: 67-75.e1
77. Karam BS, Chavez-Moreno A, Koh W, Akar JG, Akar FG (2017) Oxidative stress and inflammation as central mediators of atrial fibrillation in obesity and diabetes. *Cardiovasc Diabetol* 16: 120
78. Kelly BD, Hackett SF, Hirota K, Oshima Y, Cai Z, Berg-Dixon S, Rowan A, Yan Z, Campochiaro PA, Semenza GL (2003) Cell type-specific regulation of angiogenic growth factor gene expression and induction of angiogenesis in nonischemic tissue by a constitutively active form of hypoxia-inducible factor 1. *Circ Res* 93: 1074–1081
79. Kim KW, Lee SJ, Kim JC (2017a) TNF- α upregulates HIF-1 α expression in pterygium fibroblasts and enhances their susceptibility to VEGF independent of hypoxia. *Exp Eye Res* 164: 74–81
80. Kim N, Jung Y, Nam M, Sun Kang M, Lee MK, Cho Y, Choi E-K, Hwang G-S, Soo Kim H (2017b) Angiotensin II affects inflammation mechanisms via AMPK-related signalling pathways in HL-1 atrial myocytes. *Sci Rep* 7: 10328
81. Kim YM, Kattach H, Ratnatunga C, Pillai R, Channon KM, Casadei B (2008) Association of atrial nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase activity with the development of atrial fibrillation after cardiac surgery. *J Am Coll Cardiol* 51: 68–74
82. Kocha KM, Reilly K, Porplycia DSM, McDonald J, Snider T, Moyes CD (2015) Evolution of the oxygen sensitivity of cytochrome c oxidase subunit 4. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 308: R305-20
83. Kochiadakis GE und Kallergis EM (2012) Impact of Atrial Fibrillation on Coronary Blood Flow: A Systematic Review. *J Atr Fibrillation* 5: 458
84. Kolwicz SC, Purohit S, Tian R (2013) Cardiac metabolism and its interactions with contraction, growth, and survival of cardiomyocytes. *Circ Res* 113: 603–616
85. Korantzopoulos P, Kolettis TM, Kountouris E, Dimitroula V, Karanikis P, Pappa E, Siogas K, Goudevenos JA (2005) Oral vitamin C administration reduces early recurrence rates after electrical cardioversion of persistent atrial fibrillation and attenuates associated inflammation. *Int J Cardiol* 102: 321–326

86. Kosiuk J, Potter T de, Linz D (2018) The role of electroanatomical mapping in individualized treatment of paroxysmal atrial fibrillation. *Int J Cardiol* 259: 105–106
87. Kwast KE, Burke PV, Poyton RO (1998) Oxygen sensing and the transcriptional regulation of oxygen-responsive genes in yeast. *J Exp Biol* 201: 1177–1195
88. Lam YT (2015) Critical Roles of Reactive Oxygen Species in Age-Related Impairment in Ischemia-Induced Neovascularization by Regulating Stem and Progenitor Cell Function. *Oxid Med Cell Longev* 2015: 7095901
89. Larsen S, Stride N, Hey-Mogensen M, Hansen CN, Bang LE, Bundgaard H, Nielsen LB, Helge JW, Dela F (2013) Simvastatin effects on skeletal muscle: relation to decreased mitochondrial function and glucose intolerance. *J Am Coll Cardiol* 61: 44–53
90. Lau DH, Linz D, Schotten U, Mahajan R, Sanders P, Kalman JM (2017) Pathophysiology of Paroxysmal and Persistent Atrial Fibrillation: Rotors, Foci and Fibrosis. *Heart Lung Circ* 26: 887–893
91. Li D, Shinagawa K, Pang L, Leung TK, Cardin S, Wang Z, Nattel S (2001) Effects of angiotensin-converting enzyme inhibition on the development of the atrial fibrillation substrate in dogs with ventricular tachypacing-induced congestive heart failure. *Circulation* 104: 2608–2614
92. Li P, Jiao J, Gao G, Prabhakar BS (2012) Control of mitochondrial activity by miRNAs. *J Cell Biochem* 113: 1104–1110
93. Li X, Tjwa M, van Hove I, Enholm B, Neven E, Paavonen K, Jeltsch M, Juan TD, Sievers RE, Chorianopoulos E, Wada H, Vanwildemeersch M, Noel A, Foidart J-M, Springer ML, Degenfeld G von, Dewerchin M, Blau HM, Alitalo K, Eriksson U, Carmeliet P, Moons L (2008) Reevaluation of the role of VEGF-B suggests a restricted role in the revascularization of the ischemic myocardium. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28: 1614–1620
94. Li Y, Park J-S, Deng J-H, Bai Y (2006) Cytochrome c oxidase subunit IV is essential for assembly and respiratory function of the enzyme complex. *J Bioenerg Biomembr* 38: 283–291
95. Little AG, Kocha KM, Loughheed SC, Moyes CD (2010) Evolution of the nuclear-encoded cytochrome oxidase subunits in vertebrates. *Physiol Genomics* 42: 76–84

96. Little AG, Lau G, Mathers KE, Leary SC, Moyes CD (2018) Comparative biochemistry of cytochrome c oxidase in animals. *Comp Biochem Physiol B, Biochem Mol Biol* 224: 170–184
97. Lu Y, Zhang Y, Wang N, Pan Z, Gao X, Zhang F, Zhang Y, Shan H, Luo X, Bai Y, Sun L, Song W, Xu C, Wang Z, Yang B (2010) MicroRNA-328 contributes to adverse electrical remodeling in atrial fibrillation. *Circulation* 122: 2378–2387
98. Lubbers ER, Price MV, Mohler PJ (2018) Arrhythmogenic Substrates for Atrial Fibrillation in Obesity. *Front Physiol* 9: 1482
99. Luo X, Zhang H, Xiao J, Wang Z (2010) Regulation of human cardiac ion channel genes by microRNAs: theoretical perspective and pathophysiological implications. *Cell Physiol Biochem* 25: 571–586
100. Manalo DJ, Rowan A, Lavoie T, Natarajan L, Kelly BD, Ye SQ, Garcia JGN, Semenza GL (2005) Transcriptional regulation of vascular endothelial cell responses to hypoxia by HIF-1. *Blood* 105: 659–669
101. Marcoff L und Thompson PD (2007) The role of coenzyme Q10 in statin-associated myopathy: a systematic review. *J Am Coll Cardiol* 49: 2231–2237
102. Mason MG, Nicholls P, Cooper CE (2014) Re-evaluation of the near infrared spectra of mitochondrial cytochrome c oxidase: Implications for non invasive in vivo monitoring of tissues. *Biochim Biophys Acta* 1837: 1882–1891
103. Montaigne D, Marechal X, Lefebvre P, Modine T, Fayad G, Dehondt H, Hurt C, Coisne A, Koussa M, Remy-Jouet I, Zerimech F, Boulanger E, Lacroix D, Staels B, Neviere R (2013) Mitochondrial dysfunction as an arrhythmogenic substrate: a translational proof-of-concept study in patients with metabolic syndrome in whom post-operative atrial fibrillation develops. *J Am Coll Cardiol* 62: 1466–1473
104. Murray AJ und Horscroft JA (2016) Mitochondrial function at extreme high altitude. *J Physiol (Lond)* 594: 1137–1149
105. Musatov A und Robinson NC (2014) Bound cardiolipin is essential for cytochrome c oxidase proton translocation. *Biochimie* 105: 159–164
106. Nakamori S, Nezafat M, Ngo LH, Manning WJ, Nezafat R (2018) Left Atrial Epicardial Fat Volume Is Associated With Atrial Fibrillation: A Prospective Cardiovascular Magnetic Resonance 3D Dixon Study. *J Am Heart Assoc* 7:

107. Napiwotzki J und Kadenbach B (1998) Extramitochondrial ATP/ADP-ratios regulate cytochrome c oxidase activity via binding to the cytosolic domain of subunit IV. *Biol Chem* 379: 335–339
108. Nattel S (2017) Molecular and Cellular Mechanisms of Atrial Fibrosis in Atrial Fibrillation. *JACC Clin Electrophysiol* 3: 425–435
109. Neuzner J und Pitschner HF (2000) VHF, Vorhofflattern. Steinkopff Darmstadt
110. Ozerova IN, Paramonova IV, Olfer'ev AM, Akhmedzhanov NM, Aleksandrova MA, Perova NV (2001) Effects of simvastatin on the phospholipid composition of high-density lipoproteins in patients with hypercholesterolemia. *Bull Exp Biol Med* 132: 763–765
111. Pandit SV und Jalife J (2013) Rotors and the dynamics of cardiac fibrillation. *Circ Res* 112: 849–862
112. Pierri MD, Crescenzi G, Zingaro C, D'Alfonso A, Capestro F, Scocco V, Brugia M, Torracca L (2016) Prevention of atrial fibrillation and inflammatory response after on-pump coronary artery bypass using different statin dosages: a randomized, controlled trial. *Gen Thorac Cardiovasc Surg* 64: 395–402
113. Pistoia F, Sacco S, Tiseo C, Degan D, Ornello R, Carolei A (2016) The Epidemiology of Atrial Fibrillation and Stroke. *Cardiol Clin* 34: 255–268
114. Porplycia D, Lau GY, McDonald J, Chen Z, Richards JG, Moyes CD (2017) Subfunctionalization of COX4 paralogs in fish. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 312: R671-R680
115. Prabu SK, Anandatheerthavarada HK, Raza H, Srinivasan S, Spear JF, Avadhani NG (2006) Protein kinase A-mediated phosphorylation modulates cytochrome c oxidase function and augments hypoxia and myocardial ischemia-related injury. *J Biol Chem* 281: 2061–2070
116. Pugh CW und Ratcliffe PJ (2017) New horizons in hypoxia signaling pathways. *Exp Cell Res* 356: 116–121
117. Qi X-F, Zheng L, Lee K-J, Kim D-H, Kim C-S, Cai D-Q, Wu Z, Qin J-W, Yu Y-H, Kim S-K (2013) HMG-CoA reductase inhibitors induce apoptosis of lymphoma cells by promoting ROS generation and regulating Akt, Erk and p38 signals via suppression of mevalonate pathway. *Cell Death Dis* 4: e518
118. Qiu C, Zhao X, Zhou Q, Zhang Z (2017) High-density lipoprotein cholesterol efflux capacity is inversely associated with cardiovascular risk: a systematic review and meta-analysis. *Lipids Health Dis* 16: 212

119. Ramesh R, Munshi A, Panda SK (1992) Polymerase chain reaction. *Natl Med J India* 5: 115–119
120. Ravelli F und Allesie M (1997) Effects of atrial dilatation on refractory period and vulnerability to atrial fibrillation in the isolated Langendorff-perfused rabbit heart. *Circulation* 96: 1686–1695
121. Rovira-Llopis S, Bañuls C, Diaz-Morales N, Hernandez-Mijares A, Rocha M, Victor VM (2017) Mitochondrial dynamics in type 2 diabetes: Pathophysiological implications. *Redox Biol* 11: 637–645
122. Samavati L, Lee I, Mathes I, Lottspeich F, Hüttemann M (2008) Tumor necrosis factor alpha inhibits oxidative phosphorylation through tyrosine phosphorylation at subunit I of cytochrome c oxidase. *J Biol Chem* 283: 21134–21144
123. Saravanan P, Bridgewater B, West AL, O'Neill SC, Calder PC, Davidson NC (2010) Omega-3 fatty acid supplementation does not reduce risk of atrial fibrillation after coronary artery bypass surgery: a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *Circ Arrhythm Electrophysiol* 3: 46–53
124. Schiffer TA, Peleli M, Sundqvist ML, Ekblom B, Lundberg JO, Weitzberg E, Larsen FJ (2016) Control of human energy expenditure by cytochrome c oxidase subunit IV-2. *Am J Physiol , Cell Physiol* 311: C452–61
125. Schotten U, Dobrev, Dobromir, Kirchhof, Paulus, Kääb, Stefan, Lewalter, Thorsten, Goette, Dobrev A, Kirchhof P, Kääb S, Lewalter T, Goette A (2006) VHF: Grundlagenforschung liefert neue Therapieansätze. *Deutsches Ärzteblatt* 103: 1491–1497
126. Schotten U, Verheule S, Kirchhof P, Goette A (2011) Pathophysiological mechanisms of atrial fibrillation: a translational appraisal. *Physiol Rev* 91: 265–325
127. Schuster SJ, Wilson JH, Erslev AJ, Caro J (1987) Physiologic regulation and tissue localization of renal erythropoietin messenger RNA. *Blood* 70: 316–318
128. Schwarz K, Siddiqi N, Singh S, Neil CJ, Dawson DK, Frenneaux MP (2014) The breathing heart - mitochondrial respiratory chain dysfunction in cardiac disease. *Int J Cardiol* 171: 134–143
129. Semenza GL (2003) Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 3: 721–732
130. Semenza GL (2011) Hypoxia-inducible factor 1: regulator of mitochondrial metabolism and mediator of ischemic preconditioning. *Biochim Biophys Acta* 1813: 1263–1268

131. Semenza GL (2019) Pharmacologic Targeting of Hypoxia-Inducible Factors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 59: 379–403
132. Semenza GL, Rue EA, Iyer NV, Pang MG, Kearns WG (1996) Assignment of the hypoxia-inducible factor 1alpha gene to a region of conserved synteny on mouse chromosome 12 and human chromosome 14q. *Genomics* 34: 437–439
133. Shinzawa-Itoh K, Aoyama H, Muramoto K, Terada H, Kurauchi T, Tadehara Y, Yamasaki A, Sugimura T, Kurono S, Tsujimoto K, Mizushima T, Yamashita E, Tsukihara T, Yoshikawa S (2007) Structures and physiological roles of 13 integral lipids of bovine heart cytochrome c oxidase. *EMBO J* 26: 1713–1725
134. Sinkler CA, Kalpage H, Shay J, Lee I, Malek MH, Grossman LI, Hüttemann M (2017) Tissue- and Condition-Specific Isoforms of Mammalian Cytochrome c Oxidase Subunits: From Function to Human Disease. *Oxid Med Cell Longev* 2017: 1534056
135. Slagsvold KH, Johnsen AB, Rognmo O, Høydal MA, Wisløff U, Wahba A (2014) Mitochondrial respiration and microRNA expression in right and left atrium of patients with atrial fibrillation. *Physiol Genomics* 46: 505–511
136. Spieckermann PG (1979) Coronarkreislauf und myokardialer Energiebedarf. Schara (Hg.) 1979 – Coronare Herzkrankheit 1–12
137. Takano N, Amiya E, Oguri G, Nakayama A, Taya M, Nakajima T, Morita H, Komuro I (2019) Influence of atrial fibrillation on oxygen uptake and exercise tolerance in cardiovascular patients; close association with heart rate response. *Int J Cardiol Heart Vasc* 22: 84–91
138. Tian H, McKnight SL, Russell DW (1997) Endothelial PAS domain protein 1 (EPAS1), a transcription factor selectively expressed in endothelial cells. *Genes Dev* 11: 72–82
139. Trieb M, Kornej J, Knuplez E, Hindricks G, Thiele H, Sommer P, Scharnagl H, Dagres N, Dinov B, Bollmann A, Husser D, Marsche G, Buettner P (2019) Atrial fibrillation is associated with alterations in HDL function, metabolism, and particle number. *Basic Res Cardiol* 114: 27
140. van Bragt KA, Nasrallah HM, Kuiper M, Luiken JJ, Schotten U, Verheule S (2014) Atrial supply-demand balance in healthy adult pigs: coronary blood flow, oxygen extraction, and lactate production during acute atrial fibrillation. *Cardio-vasc Res* 101: 9–19

141. Vogt S, Portig I, Kusch B, Pankuweit S, Sirat AS, Troitzsch D, Maisch B, Moosdorf R (2004) Detection of anti-hsp70 immunoglobulin G antibodies indicates better outcome in coronary artery bypass grafting patients suffering from severe preoperative angina. *Ann Thorac Surg* 78: 883-9; discussion 889
142. Vogt S, Rhiel A, Weber P, Ramzan R (2016) Revisiting Kadenbach: Electron flux rate through cytochrome c-oxidase determines the ATP-inhibitory effect and subsequent production of ROS. *Bioessays* 38: 556–567
143. Vogt S, Ruppert V, Pankuweit S, Paletta JPJ, Rhiel A, Weber P, Irqsusi M, Cybulski P, Ramzan R (2018) Myocardial insufficiency is related to reduced subunit 4 content of cytochrome c oxidase. *J Cardiothorac Surg* 13: 1–9
144. Voigt N, Heijman J, Wang Q, Chiang DY, Li N, Karck M, Wehrens XHT, Nattel S, Dobrev D (2014) Cellular and molecular mechanisms of atrial arrhythmogenesis in patients with paroxysmal atrial fibrillation. *Circulation* 129: 145–156
145. Vural Ü, Balcı AY, Ağlar AA, Kızılay M (2018) Which Method to Use for Surgical Ablation of Atrial Fibrillation Performed Concomitantly with Mitral Valve Surgery: Radiofrequency Ablation versus Cryoablation. *Braz J Cardiovasc Surg* 33: 542–552
146. Wang GL, Jiang BH, Rue EA, Semenza GL (1995) Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 5510–5514
147. Wang H, Han X, Wittchen ES, Hartnett ME (2016) TNF- α mediates choroidal neovascularization by upregulating VEGF expression in RPE through ROS-dependent β -catenin activation. *Mol Vis* 22: 116–128
148. Wang Z, Lu Y, Yang B (2011) MicroRNAs and atrial fibrillation: new fundamentals. *Cardiovasc Res* 89: 710–721
149. White CW, Kerber RE, Weiss HR, Marcus ML (1982) The effects of atrial fibrillation on atrial pressure-volume and flow relationships. *Circ Res* 51: 205–215
150. Wijesurendra RS, Liu A, Notaristefano F, Ntusi NAB, Karamitsos TD, Bashir Y, Ginks M, Rajappan K, Betts TR, Jerosch-Herold M, Ferreira VM, Neubauer S, Casadei B (2018) Myocardial Perfusion Is Impaired and Relates to Cardiac Dysfunction in Patients With Atrial Fibrillation Both Before and After Successful Catheter Ablation. *J Am Heart Assoc* 7: e009218

151. Xie H-C, Li J-G, He J-P (2017) Differential responsiveness in VEGF receptor subtypes to hypoxic stress in various tissues of plateau animals. *Physiol Res* 66: 357–362
152. Youn J-Y, Zhang J, Zhang Y, Chen H, Liu D, Ping P, Weiss JN, Cai H (2013) Oxidative stress in atrial fibrillation: an emerging role of NADPH oxidase. *J Mol Cell Cardiol* 62: 72–79
153. Zimna A und Kurpisz M (2015) Hypoxia-Inducible Factor-1 in Physiological and Pathophysiological Angiogenesis: Applications and Therapies. *Biomed Res Int* 2015: 549412
154. Zlobine I, Gopal K, Ussher JR (2016) Lipotoxicity in obesity and diabetes-related cardiac dysfunction. *Biochim Biophys Acta* 1861: 1555–1568
155. Zoni-Berisso M, Lercari F, Carazza T, Domenicucci S (2014) Epidemiology of atrial fibrillation: European perspective. *Clin Epidemiol* 6: 213–220
156. Zorov DB, Juhaszova M, Sollott SJ (2014) Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release. *Physiol Rev* 94: 909–950
157. Zykov V, Krekhov A, Bodenschatz E (2017) Fast propagation regions cause self-sustained reentry in excitable media. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114: 1281–1286

Anhang

Liste akademischer Lehrer

Meine akademischen Lehrer in Marburg waren:

Adamkiewicz, Bartsch, Bauer, Baum, Becker, Becker, Bien, Bliemel, Bösner, Burchert, Cetin, Czubayko, Daut, Decher, Del Rey, Donner-Banzhoff, Eberhart, Eggers, Fendrich, Feuser, Frink, Fritz, Gallmeier, Geisthoff, Geks, Geraerds, Gress, Hegeler, Hertl, Hildebrandt, Hoyer, Jerrentrup, Josephs, Kalder, Kann, Kanngießer, Karatolios, Kinscherf, Kircher, Kirschbaum, Kluge, Knake, Köhler, König, Kolb-Niemann, Kruse, Kühnert, Lill, Lohoff, Luster, Mahnken, Mirow, Moll, Neubauer, Neumüller, Nimsky, Oberwinkler, Oliver, Opitz, Pagenstecher, Plant, Preisig-Müller, Renz, Ruchholtz, Sahmland, Schieffer, Schoner, Schröder, Schu, Schultz, Sekundo, Sevinc, Sommer, Stahl, Steiniger, Stibane, Stiewe, Tackenberg, Teymoortash, Thieme, Timmermann, Timmesfeld, Vogelmeier, Vogt, Wagner, Weihe, Westermann, Wilhelm, Worzfeld, Wrocklage, Wulf.

Danksagung

Zunächst möchte ich meinem Doktorvater Prof. Vogt für die sehr gute Betreuung, die konstruktive Kritik und den Zeitaufwand danken. Die vielen aufschlussreichen Gespräche und Ideengebungen haben mich stets motiviert und inhaltlich weitergebracht.

Mein besonderer Dank gilt außerdem Dr. Ruppert und Dr. Soufi, die mir immer mit Rat und Tat zur Seite standen. Durch eine sehr angenehme Atmosphäre und ständige fachliche Unterstützung im Labor waren sie auch in schwierigen Phasen für mich da und schenkten mir Kraft und Motivation.

Ich danke Prof. Culmsee und Prof. Pankuweit, in deren Laboren ich einen Teil meiner Versuche durchführen durfte. Ebenfalls danke ich Heike Eckhardt und Katharina Hoyer-Weiß für die stets sehr freundliche Hilfsbereitschaft.

Mein spezieller Dank gilt neben meinen engsten Freunden, meinen Eltern Katja und Jörg Cybulski und meinem Bruder Jonas Cybulski, die mich zu jeder Zeit unterstützt und motiviert haben und ohne die diese Arbeit niemals möglich gewesen wäre. Schließlich danke ich meinem Freund und größtem Rückhalt Felix Erdmann für seine unermüdliche Unterstützung.